

CAPSAICIN ÉS ANANDAMID HATÁSAINAK VIZSGÁLATA PATKÁNY
TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJTEKEN

EGYETETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

SZÓKE ÉVA

PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. SZOLCSÁNYI JÁNOS

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZOLCSÁNYI JÁNOS

PROF. DR. CZÉH GÁBOR

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET
MTA NEUROFARMAKOLÓGIAI KUTATÓCSOPORT, PÉCS

2002

TARTALOMJEGYZÉK

Általános bevezetés	3
A capsaicin-érzékeny szenzoros neuronokról	3
Capsaicin receptor, capsaicin-analógok	5
A capsaicin előkezelés „neurotoxikus” hatása a szenzoros neuronokon	7
Anandamid hatása a szenzoros neuronokon	8
Az értekezés célkitűzései	10
I. Újszülöttkori szisztémás capsaicin kezelés hatásának elektronmikroszkópos és funkcionális vizsgálata patkány trigeminális ganglionsejteken. NGF hatásának vizsgálata capsaicin-kezelt állatok trigeminális ganglionsejtjein	11
II. Capsaicin és anandamid hatásának vizsgálata patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészetben intracelluláris kalciumionszint-méréssel	31
III. Újszülöttkori anandamid kezelés hatásának vizsgálata patkány trigeminális ganglionsejteken összehasonlítva a capsaicin kezelés következményeivel.	43
I. A mitokondriumok szerepének vizsgálata a capsaicin hatásmechanizmusának kialakulásában patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészetben intracelluláris kalciumionszint-mérés módszerével	54
A legfontosabb új eredmények összefoglalása	63
Köszönetnyilvánítás	64
Hivatkozott közlemények jegyzéke	65
Saját publikációk jegyzéke	75

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A CAPSAICIN-ÉRZÉKENY SZENZOROS NEURONOKRÓL

Az elsődleges érzőneuronok vizsgálatában fontos szerepe van a paprika (*Capsicum annuum*) csípőanyagának, a *capsaicinnek* (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), melynek első farmakológiai vizsgálata magyar tudósok nevéhez fűződik (Högyes, 1878, Jancsó Miklós, 1955). A capsaicin szelektív hatására már ezek a korai vizsgálatok is felhívták a figyelmet, és különösen fontos volt Jancsó Miklósnak az a megfigyelése, mely szerint capsaicin nagy dózisa után a kémiai fájdalomkeltő anyagokkal szemben deszenzibilizáció alakul ki. További vizsgálatok bizonyították, hogy a capsaicin szelektíven izgatja majd károsítja a hátsó gyöki illetve a trigeminális elsődleges érzőneuronok egy csoportját (Joó és mtsai, 1969, Szolcsányi és mtsai, 1975). A capsaicin-érzékeny primer afferens neuronoknak (Szolcsányi, 1982) ehhez a populációjához tartoznak a C-polimodális nociceptorok, az A δ -polimodális nociceptorok, melyek forró ingerekkel, kémiai fájdalomkeltő anyagokkal és mechanikai ingerekkel egyaránt aktiválhatóak. Egyrost elvezetési adatok alapján (l. Szolcsányi 1993, 1996) a polimodális nociceptorokon kívül, - mely a bőr vékony rostú afferenciájának mintegy 50%-át képezi a capsaicin a forró receptorokat, fizikai ingerekkel nem aktiválható kemonociceptorokat és a meleg receptorokat is izgatja. Patkány, nyúl, macska, majom és ember bőridegeiről elvezetett egyrost vizsgálatok alapján bizonyított ez a szelektív hatás. Ezzel szemben a bőr összes C, A δ vagy A β rostú mechanoreceptor típusát nem aktiválta a capsaicin (l. Szolcsányi 1996).

A polimodális nociceptív afferensek izgatása a klasszikus afferens válasz mellett lokális efferens (Holzer, 1988, Szolcsányi, 1984), sőt szisztémás szöveti hatásokat is okoz (Szolcsányi, 1996, Szolcsányi és mtsai, 1998a, b). Antidrómos izgatásra, vagy kémiai, mechanikai és hőingerek hatására az idegvégződésekből neuropeptidek, nevezetesen calcitonon gén-rokon peptid (CGRP), tachykininek (substance P (SP), neurokinin-A (NKA)) valamint szomatosztatin szabadulnak fel. A felszabaduló CGPR és SP neurogén gyulladást, mint lokális választ váltanak ki az innervációs

területen. Ennek összetevői az arteriolás vazodilatáció, és vénás plazma extravazáció. A CGRP az érfal simaizom sejteinek falán elhelyezkedő CGRP-1 receptorokon keresztül fejt ki vazodilatációt és mikrocirkulációt fokozó hatását. Az SP hatására vazodilatáció és plazma extravazáció egyaránt kialakul az endotélien lévő NK-1 receptorok közvetítésével. A CGRP önmagában nem vált ki plazma extravazációt, de fokozza az SP hatását. Capsaicin hatására a perifériás idegvégződésekből a fent említett tachykininek és neuropeptidok szabadulnak fel. Ez a centrális végződésekből való anyag-felszabadulással társul, de összetételében és különösen fiziológiai hatásában, következményeiben nem azonos vele, sőt a centrális és a perifériás terminálisokból való peptidfelszabadulás egymástól független is lehet.

Érződúcokban a szenzoros neuronok két fő csoportját szövettani festődési tulajdonságaik alapján meg tudjuk különböztetni (Andres, 1961, Lieberman, 1976). Az egyik csoportba nagyobb, világosan festődő sejtek tartoznak, ezeket A típusú sejteknek hívjuk, az átmérőjük 25-80 μm . Az ezekhez tartozó axonok vastagabbak és velőhüvelyesek. A másik csoportba a kisebb (többnyire 10-25 μm , de nem ritkán nagyobb átmérőjű), sötétén festődő B-típusú sejtek tartoznak. Axonjaik velőtlen, C-típusú, vagy vékony velőhüvelyű A δ rostok. A festődésbeli különbségek onnan erednek, hogy a nagyobb A-típusú sejtekben sok a világosan festődő neurofilamentum. Az endoplazmás retikulum rövidebb lamellákból áll és a mitokondriumok egyenletesen oszlanak el a citoplazmában. A kisebb B-típusú sejtek citoplazmája a sok szabad riboszóma, valamint kevesebb neurofilament miatt sötétebbre festődik. Az endoplazmás retikulum lamellái úgynevezett Nissl-testeket alkotnak, több bennük a Golgi apparátus, ezek jobban struktúráltak mint az A sejtekben. A mitokondriumok a sejtmag körüli régióban koncentrálnak. Az endoplazmás retikulum, a Golgi apparátus és a lizoszómák egy komplex rendszert (GERL) alkotnak ezekben a sejtekben. A kis sejtek isolectin (IB4) immunpozitív alcsoportjában neuropeptideket, legtöbb sejtben például CGRP-t illetve tachykininiket (SP, NKA) és receptoraikat lehet kimutatni, de sok a galanin, szomatosztatin, neuropeptid-Y, vazointesztinális polipeptid tartalmú is közöttük. A ko-

lokalizációk rendje bonyolult, sok alcsoportot sikerült jellemezni az érzőneuronokon belül.

A nagyobb A-típusú sejtekre más markerek, például a parvalbumin, calbindin, calretinin jellemzők, de a sejt méret, vagy festődési tulajdonság, illetve más klasszifikáció szerint megnevezett csoportok között előfordulnak átfedések is. Az RT97 anti-neurofilament antitest az A-típusú sejteket szelektíven tünteti fel, így alkalmas a két sejt típus elkülönítésére (Lawson és Harper, 1994, Lawson és Waddell, 1991). Bonyolítja a képet, hogy különböző sérülések (gyulladás, axonmetszés) következtében megváltozhat a fehérjék, neuropeptidok eloszlása, nőhet vagy csökkenhet százalékos eloszlásuk (fenotípus váltás) mert több a neuronok túléléséhez, regenerációjához szükséges faktor és hiányzik az innervált szövetekből származó növekedési faktorok egy része. A neurokémiai tulajdonságok között esetenként szoros, máskor laza összefüggésekre lehet következtetni.

CAPSAICIN-RECEPTOR, CAPSAICIN ANALÓGOK

A capsaicinnel végzett szerkezet-hatás vizsgálatok vetették fel először egy specifikus, capsaicinnel aktiválható farmakológiai receptor létezését (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975, 1976). Az erről megjelent első közlések után több mint 20 évvel sikerült a receptor létezését klónozással bizonyítani (Caterina és mtsai, 1997). A receptor a vanilloid receptor (VR1) nevet viseli, mely utal arra, hogy capsaicinen kívül egyéb vanilloid anyagok (pl. resiniferatoxin) is képesek aktiválni. A VR1 capsaicin receptor nem-szelektív kationcsatorna, mely leginkább a kalciumionra permeábilis (Bevan és Szolcsányi, 1990, Caterina és mtsai, 1997). Mivel a savas pH, vagyis magas protonkoncentráció és 48°C-nál magasabb fájdalmas hőinger is nyitja a VR1 kationcsatornát, így e két utóbbi inger a receptor természetes aktivátorának, a VR1 pedig a fájdalmas fizikai és kémiai ingerek molekuláris integrátorának tekinthető (Tominaga és mtsai, 1998). A capsaicin molekula kötődése a receptorhoz megnyitja a kation csatornát, a befelé irányuló kationáram membrándepolarizációt okoz, majd akciós potenciál keletkezik. A gerincvelő hátsó szarvában másodrendű neuronokra tevődik át az ingerület

és nociceptív vagy fájdalomingerként jelentkeznek. A VR1 receptorok jelen vannak a capsaicin-érzékeny szenzoros neuronok minden részén, a szómán, végig az axonon, valamint a perifériás és centrális idegvégződéseken. Újabban néhány adat utal arra is, hogy a szenzoros neuronok mellett az idegrendszer számos területén (a limbikus rendszer struktúrái, striátum, hipotalamusz preoptikus áréája, talamusz, kisagy, híd) a korábbi resiniferatoxin kötődésekkel ellentétben PCR technikával sikerült VR1 receptort kimutatni. (Sasamura és mtsai, 1998, Mezey és mtsai, 2000). A receptor az idegsejt szómájában a plazmamembránhoz, valamint a Golgi-apparátushoz kötötten fordul elő, az idegvégzésekbe pedig axonális transzporttal jut el (Szallasi és Blumberg, 1999).

Napjainkban már több olyan anyagot ismerünk melyek képesek hatni a VR1 receptoron. Ezek között vannak szintetikus anyagok, mint az olvanil, nuvanil, valamint a természetben is előforduló anyagok, mint például a zingeron, piperin, resiniferatoxin, guajacol, eugenol, triprenyl fenolok és terpenoidok. A felsorolt anyagok különbözhetnek mind receptort izgató, mind deszenzitizáló hatásukban. A csípőanyagok masszív kationáramot okoznak, gyorsan nyitják a csatornát, míg az enyhén csípő vegyületek lassan nyitják azt, és így feltehetően nem mindig elegendő mértékű az ionáram az akciós potenciál generálásához. Különösen érdekes az *Euphorbia resinifera*-ból nyert resiniferatoxin (RTX), mely különböző receptorkötési és deszenzitizációs vizsgálatokban több ezerszer mutatkozott hatásosabbnak mint a capsaicin (Blumberg és mtsai, 1993, Szallasi és Blumberg, 1990, 1999). Az RTX csatornanyitási kinetikája bizonyítottan lassabb mint a capsaiciné (Liu és mtsai, 1998), és képes a pulmonális kemoreflexet előzetes aktiváció nélkül deszenzitizálni (Szolcsányi és mtsai, 1989). Korábban feltételezték, hogy a capsaicin és az RTX két külön receptor altípuson hatnak, C-típusú és R-típusú receptor altípusok létezéséről beszéltek. A VR1 receptor klónozása azonban bizonyította, hogy egyazon receptort aktiválja mindkét agonista vegyület.

A VR1 receptor klónozása óta megnövekedett az érdeklődés a vanilloid-kutatás területén, mivel a receptor inaktiválása előzetes izgatás nélkül elvezethet az első olyan fájdalomcsillapító gyógyszerhez, mely szelektíven a

nociceptorokon fejt ki hatását. Azóta már több olyan molekulát találtak melyek nagyfokú hasonlóságot mutatnak a VR1-el. Ilyen a VRL1 (vanilloid receptor-like protein) melyet a magas hő aktivál, valamint a SIC (stretch-inhibitable channel) mely mechanoszenzitív tulajdonságokkal bír (Szallasi és Di Marzo, 2000). A VR1 receptoron kívül azonban továbbra sem találtak olyan rokon molekulát, mely capsaicinnel, RTX-el vagy más vanilloid struktúrával aktiválható lett volna.

A CAPSAICIN ELŐKEZELÉS „NEUROTOXIKUS” HATÁSA A SENZOROS NEURONOKON

Újszülöttkori capsaicin előkezelés után felnőtt állatban szignifikánsan kevesebb a B-típusú szenzoros neuronok és a velőhüvely nélküli rostok száma (Jancsó és mtsai, 1977, Nagy és mtsai, 1980, Jancsó és Király, 1981, Nagy és mtsai, 1983 Lawson, 1987, Sugimoto és mtsai, 1998). Ezzel szemben hasonló sejtpusztulást felnőttkori előkezelés után nem sikerült kimutatni és a hátsó gyöki C-típusú afferens rostok száma sem csökkent (Joó és mtsai, 1969, Szolcsányi és mtsai, 1975, Sugimoto és mtsai, 1998). Újszülött állatokban a capsaicin okozta károsodást akut neurotoxikus sejtpusztulásként írták le, mely fél óra alatt már manifesztálódik (Jancsó és mtsai, 1977, Jancsó és Király, 1981, Jancsó és mtsai, 1987), ezért a szerzők a funkcionális károsodást az elpusztult neuronok hiányával magyarázzák. Felnőttkori capsaicin vagy RTX előkezelés után komoly mitokondriumkárosodás figyelhető meg egyes B sejtekben, mely napokkal sőt hetekkel az injekció után is látható, viszont a sejtest degenerációját a hátsó gyök axonszámának csökkenésével (Tandrup és mtsai, 2000) vagy az érződúc neuronjainak akut pusztulásával nem sikerült alátámasztani (Joó és mtsai, 1969, Szolcsányi és mtsai, 1975, Szallasi és mtsai, 1989, Sugimoto és mtsai, 1998). Kvantitatív morfometriás bizonyítékot találtak viszont az idegvégződések degenerációjára változatlan számú axon jelenléte mellett (Tandrup és mtsai, 2000) Az újszülöttkori és felnőttkori előkezelés celluláris hatásai közötti kvalitatív különbségek magyarázata nem ismert. A VR1 receptoron ható fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésénél lényeges

szempont, hogy az új vegyületek szintéziséhez használatos vezetőmolekulák, mint a capsaicin, RTX esetleg az anandamid rendelkeznek-e akut sejtpusztulást kiváltó neurotoxikus hatással vagy sem. Az újszülöttkori capsaicin előkezelés gyors sejtpusztulást kiváltó hatását azonban csak egyes neuronok ultrastruktúrális elváltozásaival bizonyították, és a kezelést követően kvantitatív morfometriás mérésekre érdekes módon a jelenség leírása óta eltelt több mint két évtized óta nem került sor.

ANANDAMID HATÁSA A SZENZOROS NEURONOKON

A VR1 receptor sikeres klónozása megújította az endogén ligand azonosítására tett erőfeszítéseket is. Korábbi közlések szerint a gyulladásozó folyamatokban szereplő mediátorok (bradykinin, hisztamin, szerotonin, prosztaglandin E₂) bár a capsaicin-érzékeny nociceptív érzőidegvégződéseket izgatják, de nem a VR1 receptoron hatnak (Kress és mtsai, 1997, Vyklicky és mtsai, 1998). A 2000. és 2001. években közölt bizonyítékok sora szól amellett, hogy az *anandamid* (N-arachidonilethanolamide) viszont közvetlenül a VR1 receptort aktiválja, így felmerült annak a lehetősége, hogy ez a molekula lenne a VR1 endogén ligandja (Zygmunt és mtsai, 2000, Szolcsányi, 2000a, Smart és Jerman, 2000, Szolcsányi, 2000b). Az anandamid az elsőként megismert endogén cannabinoid, melynek kimutatásával az agyban igazolták egy endogén cannabinoid szabályozó rendszer létezését (Devane és mtsai, 1992). Az anandamid a legtöbbet vizsgált cannabinoid, amely az endocannabinoidok két ismert receptor altípusa (CB1 és CB2) közül a CB1 altípushoz kapcsolódik nagyobb affinitással. CB1 receptorok agyi struktúrákon mutathatók ki, míg a CB2 receptorok jelenléte inkább az immunrendszerre jellemző. Mindkét receptor altípus a G-protein kapcsolt receptorok közé tartozik (Matsuda és mtsai, 1990, Devane és mtsai, 1988, Caulfield és Brown, 1992). A CB1 receptor aktiváció anandamid hatására az adenil cikláz valamint a feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlásához vezet, emellett a sejtekbe befelé folyó káliumáram megnövekszik. Transzmitter felszabadulást gátló hatása van, és számos idegrendszeri folyamat neuromodulátora. *In vivo* kísérletekben az

anandamid csökkenti a spontán motoros aktivitást, hipotermiát, immobilitást okoz, valamint analgetikus hatása is van (DiMarzo és mtsai, 1998, 2001). Ezek a tünetek megegyeznek a vadkender (*Cannabis sativa*) pszichoaktív hatóanyaga, a Δ^9 -tetrahydrocannabinol okozta hatásokkal (cannabimimetikus hatás), mely hatások szintén CB1 receptorok közvetítésével jelentkeznek. Az anandamid a sejtben hidrolízissel képződik egy foszfolipid prekursor molekulából, a folyamatot a foszfolipáz-D katalizálja. A bioszintézis kalciumbeáramlás hatására indul el az idegsejtekben. Az inaktiváció egy membrán transzporter segítségével a sejtbe történő visszavétel után szintén enzimatis hidrolízissel történik. Az anandamid és egy szintetikus capsaicin analóg, az olvanil kémiai hasonlósága miatt kezdték vizsgálni, hogy a vanilloidok képesek-e hatni a CB receptorokon. Az olvanilról kiderült, hogy parciális CB1 receptor agonistaként viselkedik, és akárcsak az anandamid transzport inhibitor AM404, az olvanil is képes gátolni a [³H]anandamid akkumulációt humán astrocytoma sejtekben (Beltramo és Piomelli, 1999). Ez után kerültek az érdeklődés középpontjába a vanilloid kutatás területén is a cannabinoidok és az anandamid. Az anandamid feltehetően képes a cannabinoid és a capsaicin receptorok közti interakcióra mind az idegrendszeri mind a kardiovaszkuláris struktúrákon (Zygmunt és mtsai, 1999). A 2001. évben megjelent közlések bizonyították, hogy az anandamid a cannabinoid receptorok mellett a VR1 receptort is aktiválja, a viták inkább a VR1 aktiváció fiziológiai szerepéről folynak (Zygmunt és mtsai, 2000, Szolcsányi, 2000a, Smart és Jerman, 2000, Szolcsányi, 2000b). Mivel az anandamid ellentétes hatásokat közvetít a CB1 valamint a VR1 receptor aktiváción keresztül (például a CB1 receptor aktiváció a feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlásához vezet, míg a VR1 receptor aktiválása kalciumion-beáramlást okoz a sejtekbe) ezért azokon a struktúrákon ahol mindkét receptor megtalálható, két nagyságrenddel nagyobb affinitása a CB1 receptorhoz nem engedi fiziológias körülmények között manifesztálódni a VR1 agonista hatást (Szolcsányi 2000a, 2000b). Feltételezik azt is, hogy az anandamid fiziológiai szerepe az intracelluláris szignál mechanizmusok finom szabályozása lenne (DiMarzo és mtsai, 2000, Szallasi, DiMarzo, 2000).

AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITÚZÉSEI

I. Célunk volt kvantitatív morfometriai vizsgálattal ellenőrizni újszülöttkori capsaicin előkezelés hatásait patkány trigeminális ganglion sejteken. Elektronmikroszkópos vizsgálatokat és nociceptív tesztet (capsaicin szembe cseppentésével kiváltott védekező magatartás vizsgálata) végeztünk, hogy a sejtek ultrastruktúrális állapotát valamint a nocicepció változását figyelemmel tudjuk követni. Vizsgáltuk idegnövekedési faktor ("nerve growth factor" (NGF)) kezelés hatásait capsaicin-kezelt állatok trigeminális ganglionsejtjeire.

II. Patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészetben vizsgáltuk 3 anyag, a capsaicin, anandamid és RTX neuronokra kifejtett hatását. Intracelluláris kalciumionszint-mérést végeztünk fura-2 AM fluoreszcens festéket használva. Célunk volt a capsaicin és az anandamid, mint VR1 receptor külső és endogén ligandok ganglionsejtekre kifejtett hatásainak összehasonlítása.

III. Kísérleteiben újszülöttkori anandamid és capsaicin előkezelés tartós hatásait kívántuk összevetni. A forró ingerekre adott nociceptív választ tail-flick teszttel vizsgáltuk. Ellenőriztük az előkezelés hatását az érződúcok ganglionsejtjeinek ultrastruktúrájára a kezelés után különböző időpontokban.

IV. Patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészetben fel akartuk tárni a mitokondriumok szerepét a capsaicin és RTX hatásának kialakulásában. A mitokondriumok részvételét a capsaicin intracelluláris kalciumionszintre gyakorolt hatása alapján vizsgáltuk mitokondriumpotenciált befolyásoló szerek jelenlétében.

I. ÚJSZÜLÖTTKORI SZISZTÉMÁS CAPSAICIN KEZELÉS HATÁSÁNAK ELEKTRONMIKROSKÓPOS ÉS FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA PATKÁNY TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJTEKEN. NGF HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA CAPSAICIN-KEZELT PATKÁNYOK TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJTJEIN.

Bevezetés

Újszülöttkori szisztémás capsaicin vagy RTX kezelés csökkenti a perifériás idegek C-típusú, velőhüvely nélküli rostjainak valamint az érző ganglionok B sejteinek számát patkányban (Jancsó és mtsai, 1977, Nagy és mtsai, 1980, Jancsó és Király, 1981, Nagy és mtsai, 1983 Lawson, 1987, Sugimoto és mtsai, 1998). Egyes szerzők (Lawson és Harper, 1984, Lawson, 1987) az előkezelés után a nagy, A sejtek számának csökkenését is leírták. Mások szintén újszülött egerek lumbáris hátsó gyöki ganglionjában találtak degenerálódott A sejteket capsaicin előkezelés után (Hiura és Ishizuka, 1989, Hiura, 2000). Újszülött állatokban a capsaicin okozta károsodás jellemzőjének tartják, hogy az nagyon gyorsan, 30 perc alatt vagy néhány óra alatt lezajlik (Jancsó és mtsai, 1977, Jancsó és Király, 1981, Jancsó és mtsai, 1987). Felnőtt korban kezelt patkányokban capsaicin vagy RTX kezelés után sem hasonló sejtszámcsökkenést sem a hátsó gyöki C-típusú afferens rostok számának redukcióját nem észlelték, ellenben komoly mitokondriumkárosodást figyeltek meg a hátsó gyöki és trigeminális ganglionok egyes B sejtjeiben. Az injekció után napokkal sőt hetekkel is leírtak ilyen duzzadt mitokondriumú sejteket nem csupán capsaicin, de RTX kezelés után is (Joó és mtsai, 1969, Chiba és mtsai, 1975, Szolcsányi és mtsai, 1975, Szallasi és mtsai, 1989, Szallasi, 1990, Szolcsányi, 1990, Szolcsányi és mtsai, 1990, Sugimoto és mtsai, 1998). Az érintett mitokondriumokban sérültek a belső kriszták, melyek hiányozhatnak is. Hasonló ultrastruktúrális változások láthatók a hipotalamusz preoptikus áréájában is ahol a centrális meleg receptorok lokalizálódnak (Szolcsányi és mtsai, 1971, Szolcsányi, 1982). Az előkezelt állatokban kémiai és forró

ingerekkel szembeni hosszú ideig tartó fájdalomérzés kiesés, és termoreguláció károsodása jelentkezik. Neurogén gyulladás nem alakul ki capsaicinnel kezelt patkányokban (Jancsó és mtsai, 1967, Jancsó-Gábor és mtsai, 1970, Szolcsányi és mtsai, 1975, Bevan és Szolcsányi, 1990, Szolcsányi és mtsai, 1990, Holzer, 1992, Szallasi és Blumberg, 1999).

Kísérleteink célja az volt, hogy az újszülöttkori capsaicin-kezelés hatásait több oldalról megvizsgáljuk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok mellett fiziológiai, valamint kvantitatív morfometriai vizsgálatot végeztünk.

Módszerek

1. Újszülött patkányok előkezelése capsaicinnel: Újszülött Wistar patkányokat a második napon 50 mg/kg capsaicinnel kezeltünk (s.c.) ahogy azt már korábban Jancsó és munkatársai leírták (1977). A patkányok egy csoportja a capsaicin kezelés utáni naptól számított 10 napon keresztül NGF injekciót kapott (NGF fiziológiás sóoldatban $10 \times 100 \mu\text{g/kg}$, s.c.), egy másik csoportnak csak a sóoldatot adtuk. Kontroll állatokat is használtunk, ezek a capsaicin oldószerét (10% etanol, 10% Tween 80 fiziológiás sóoldatban, s.c.) kapták.

2. Perfúzió: A patkányokat ketaminnal altattuk, transzkardiálisan 0.1 M-os foszfát pufferrel (PB, pH=7.4), majd 4%-os paraformaldehid és 1% glutáraldehid keverékével (0.1 M PB-ben) perfundáltuk. A perfúzió különböző időpontokban történt, egy nappal a capsaicin kezelés után, tehát 3 naposan, majd 1, 2, 3, 6, 10, 12, 14, 20 hetes korokban. A capsaicin+NGF-kezelt állatok esetében a perfúziót 3 hetes korban végeztük.

3. Fénymikroszkópos vizsgálatok: Négy kontroll, 4-6 capsaicin-kezelt vagy capsaicin+NGF-kezelt állat trigeminális ganglionját kimetszettük, dehidráltuk, majd paraffinba ágyaztuk és 8 μm vastag sorozatmetszeteket készítettünk belőlük. 1%-os Cresyl ibolya festékkel megfestettük majd DePexszel fedtük a metszeteket.

4. *Kvantitatív analízis:* A sejtszámolást és a sejtméret meghatározását számítógéphez csatlakoztatott Nikon mikroszkóppal, és a Neurolucida 2.0 szoftverrel végeztük. 1100-1200 sejt méretét határoztuk meg 2 kontroll és 2 capsaicin-kezelt állat ganglionjában 6 hetes korig minden korcsoportban, így az A és B sejtek arányát is megkaptuk. Csak azokat a sejteket számoltuk, melyek nukleolusza is látszott. Teljes sejtszám meghatározást is végeztünk a nukleoláris számolási módszerrel és egy korrekciós faktor (Königsmark, 1970) segítségével 1 hetes (4 kontroll, 6 capsaicin-kezelt) és 3 hetes (4 kontroll, 4 capsaicin-kezelt, 5 capsaicin+NGF-kezelt) patkányok ganglionjaiban. Az adatok statisztikai értékelése nem-parametrikus Mann-Whitney teszttel történt. Statisztikailag szignifikánsnak $p < 0,05$ érték esetén tekintettük az adatokat.

5. *Elektronmikroszkópos vizsgálatok:* Minden korcsoportból 2 kontroll és 2 capsaicin-kezelt állat, valamint 2 capsaicin+NGF-kezelt 3 hetes állat trigeminális ganglionját vizsgáltuk. A perfúzió után a ganglionokat kipreparáltuk, 1 mm³-es darabokat metszettünk belőlük, és 1-2 órán át posztfixáltuk paraformaldehid és glutáraldehid keverékben. Ezután ozmium-tetroxiddal folytattuk a fixálást, majd dehidráció után Durcupanba ágyasztuk a gangliondarabokat. Leica ultramikrotómmal 0.5 µm vastag félvékony metszeteket vágunk, toluidin-kékkel megfestettük majd fénymikroszkóp alatt megnéztük az általános struktúrát, kiválasztottuk az ultravékony (1-2 nm vastag) metszetek készítésére alkalmas területeket illetve sejteket. Mivel félvékony metszeten is feltűnik a jelentősebb capsaicin okozta sejteltérés, ilyen metszeten pár száz sejt leszámolásával következtethetünk a károsodás mértékére is. Az ultravékony metszeteket ólommal kontrasztoltuk, majd JEOL 1200 elektronmikroszkóp alatt vizsgáltuk.

6. *Kemonocicepció vizsgálata:* 3 és 6 hetes kontroll, capsaicin-kezelt és capsaicin+NGF-kezelt állatokat vizsgáltunk. 10⁻⁵ g/ml capsaicint (1%-os capsaicin törzsoldatból fiziológias sóoldatban hígítva) cseppentettünk az állatok szemébe, majd a mellső lábakkal végzett törő mozdulatokat

számoltuk, ahogy azt már korábban az úgynevezett „wiping teszt”-nél leírták (Szolcsányi és mtsai, 1975).

7. *Neurogén gyulladás vizsgálata plazma extravazáció mérésével:* Hat hetes kontroll (n=7), capsaicin-kezelt (n=7) és capsaicin+NGF kezelt (n=8) patkányokat használtunk a kísérlethez. Az állatokat natrium-thiopenthalal (Trapanal, 50 mg/kg, i.p.) altattuk, majd neurogén gyulladást váltottunk ki a lábháta bőrén paraffinolajban oldott 1 %-os mustárolaj helyi ecsetelésével. Ez a beavatkozás a capsaicin-érzékeny C-polymodális nociceptorok orthodrómos irányú szelektív kémiai izgatásával váltja ki a neurogén gyulladás fő tüneteit, az értágulatot és a plazma extravazációt (Jancsó és mtsai, 1967). A gyulladás okozta plazma extravazációt Evans kék akkumulációs módszerrel a következőképpen határoztuk meg. Az állatok a gyulladás kiváltása előtt 10 perccel vénás kanülön keresztül Evans kék festéket kaptak 50 mg/kg dózisban. Mivel ez a festék kötődik a plazma albuminhoz, a gyulladás helyén kilép az érpályából és a gyulladt szövetben történő akkumulációja arányos a plazma extravazáció mértékével. A mustárolajecsetelés után 20 perccel az állatokat elvéreztettük, a lábháti bőrt lemetszettük, majd 72 órás formamid extrakció után 620 nm-en meghatároztuk az extravazálódott festék mennyiségét. Az eredményeket $\mu\text{g/g}$ egységben nedves szövetsúlyra vonatkoztatva adtuk meg. Az adatok statisztikai értékeléséhez nem-parametrikus Mann-Whitney tesztet használtunk, szignifikánsnak a $p < 0,05$ érték esetén tekintettük az adatokat.

Eredmények

Capsaicin kezelés hatása a trigeminális ganglionsejtekre

Kontroll állatok trigeminális ganglionját vizsgálva a két fő sejttípus, az A és B sejtek szépen elkülöníthetők már fénymikroszkópos valamint félvékony metszetekről készült felvételen (*I/1a,b kép*). A bevezetőben már leírt ultrastruktúrális különbségek az elektronmikroszkópos képeken nyomomonkövethetők (*I/2a,b,c kép*).

I/1. kép. a: Patkány trigeminális ganglion fénymikroszkópos képe, 8 μm , cresyl ibolya festés. **b:** A ganglion félvékony metszetének képe, 1 μm , toluidin kék festés. A képeken jól elkülöníthetők az A és B sejtek (**A, B**). Jel: 5 μm .

Huszonnégy órával a capsaicin kezelés után néhány B sejt feltűnő ultrastrukturális károsodást mutat. Az endoplazmás retikulum, a mitokondriumok és a Golgi apparátus membránjai szakadozottak. A sejtmagban a kromatinállomány kondenzálódott, a sejtek nekrotikusak. Az A sejtek és a szatellita sejtek nem mutatnak hasonló eltéréseket. Duzzadt mitokondriumok csak az olyan B sejtekben láthatók, melyek a fent leírt membráneltéréseket is magukon viselik (*I/2d. kép*). Egy héttel a kezelés után a nekrotikus B sejtek már nem láthatók, ekkor fénymikroszkóposan nem különböztethetők meg egymástól a kezelt és a kontroll állatok ganglionsejtjei. Elektronmikroszkópban vizsgálva az 1 hetes capsaicin-kezelt állatok ganglionsejtjeit, néhány B sejtben duzzadt mitokondriumokat találtunk hiányzó belső krisztákkal, ezeknek a sejteknek a száma nő a 2. héten (*I/4a. kép*). A citoplazma más organelumai és a sejtmag teljesen épek. Az A sejtek és a szatellita sejtek is érintetlenek.

Három és hat héttel a kezelés után már olyan kifejezett a mitokondriumkárosodás, hogy a legsúlyosabban érintett B sejtek már félvékony metszeteken fénymikroszkópban is láthatók (*I/3. kép*). Ezekben nagy világos hólyagok jelzik a hiányzó krisztájú duzzadt mitokondriumokat. Capsaicin-kezelt állatokban a B sejtek 8%-a érintett 3 hetes korban (*I/4b,c. kép*), 10%-a 6 hetes korban (*I/5a,b. kép*), és 9%-a a 3 hetes capsaicin+NGF-kezelt esetben (*I/6. kép*). Az A sejtek és a szatellita sejtek épek. Elektronmikroszkópban feltűnik, hogy az érintett B sejtek szinte összes mitokondriuma károsodott, az összes belső kriszta hiányzik belőlük (*I/4c, 5a,b kép*). A többi sejtorganelum viszont ebben a korcsoportban is érintetlen, olyan mint a kontroll állatokban. Apoptotikus illetve nekrotikus sejteket sem lehet felfedezni. A leghosszabb, még vizsgált idő a capsaicin előkezeléstől számítva, a 20. hét volt. Ekkor sem láttunk apoptózisra illetve nekrozisra utaló jeleket, viszont a 14.-től a 20.-dik hétig a károsodott mitokondriumú sejtek százalékos aránya a normál sejtekhez képest csökkent, utalva arra, hogy ezek a sejtek lassan eltűnnek a ganglionokból.

I/2. kép: Patkány trigeminális ganglionjsejtek elektronmikroszkópos képe.
A: Egy A típusú sejt a jellegzetes neurofilament hálózattal (**nf**). **B és C:** B típusú sejt a szabad és membránnal asszociált riboszómával (**B**) valamint a sok mitokondriummal (**C**). **D:** Nekrotikus ganglionsejt 24 órával a capsaicin kezelés után. Az endoplazmás retikulum duzzadása látható (nyíl), duzzadt és ép mitokondriumok egyaránt előfordulnak, a nucleusban (**n**) a kromatin állomány kondenzálódása észlelhető. A szomszédos B sejt (**b**) nem mutat hasonló nekrotikus elváltozást. Jelek: A. és B: 0,2 μm , C: 1 μm , D: 2 μm .

I/3. kép: Három hetes, újszülött korban capsaicinnel kezelt patkány félvékony metszetének képe toluidin kékkel festve. A duzzadt mitokondriumok már fénymikroszkópban is láthatók (nyíl).

I/4. kép: Két hetes (**A**) és három hetes (**B,C**) újszülött korban capsaicinnel kezelt patkány trigeminális ganglionjának B-típusú sejtjeinek elektronmikroszkópos képe. **A:** Láthatjuk a mitokondriumkárosodás kezdeti jeleit (világos nyíl) és a duzzadt mitokondriumokat (sötét nyíl). A többi sejtalkotó (**g, er**) és a nucleus (**n**) ép. Jel: 1,5 μm . **B és C:** A kisebb és nagyobb nagyítású képeken is feltűnő, hogy szinte az összes mitokondrium (**m**) érintett. A többi organellum (**pr**: poliriboszóma) és a nucleus itt is ép. Jel: 0,4 μm .

I/5. kép: Hat hetes, újszülött korban capsaicinnel kezelt patkány B típusú ganglionsejtje kisebb (**A**) és nagyobb (**B**) nagyítással. A sejt szinte összes mitokondriuma mutatja a károsodás jeleit, némelyikben még láthatók a kriszták nyomai (sötét nyíl), máshol már hiányoznak (világos nyíl). A Golgi apparátus (**g**) és az endoplazmás retikulum (**er**) itt is intakt. Jel: A: 2.5 μm , B. 0,3 μm

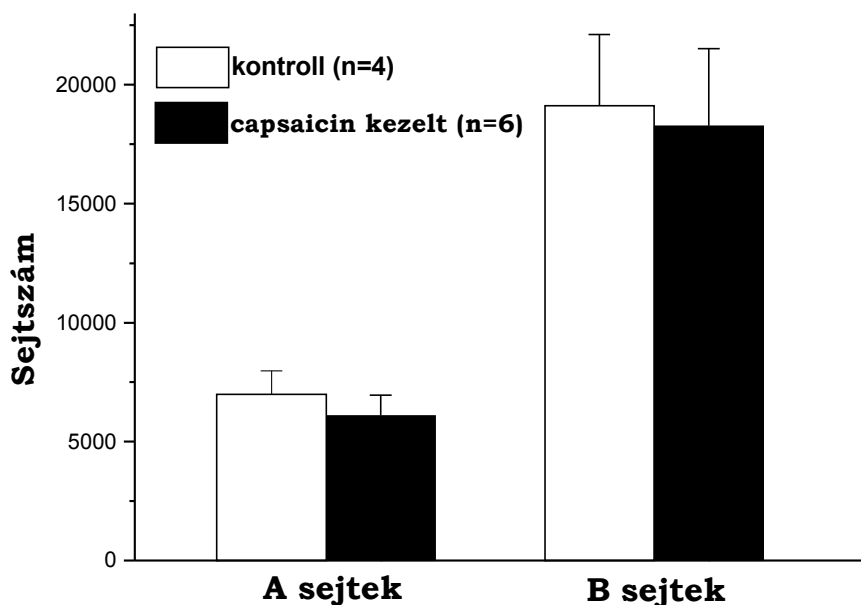
NGF kezelés hatása a capsaicin-kezelés okozta mitokondriális károsodásra

A capsaicin beadása után kezdett rendszeres, 10 napon át tartó NGF kezelés nem akadályozta meg a mitokondriális elváltozásokat a sejtekben. A 3 hetes capsaicin+NGF-kezelt állatok ganglionsejtjeiben a mitokondriumok ugyanolyan elváltozásai figyelhetők meg, mint amilyenek a csak capsaicinnel kezelt állatok hasonló korcsoportjában láthatók (I/6. kép).

I/6. kép.: Három hetes capsaicin+NGF kezelt patkány trigeminális ganglionjának B sejtje. A duzzadt mitokondriumok (**m**) mellett a többi sejtalkotó (riboszómák (**r**), Golgi apparátus (**G**), endoplazmás retikulum (**ER**)) ezekben a sejtekben is ép.

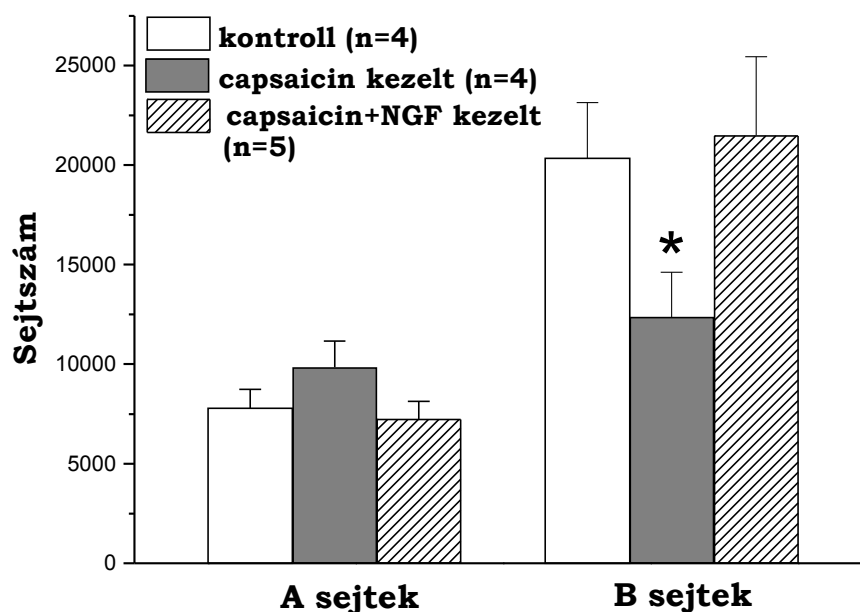
Kvantitatív adatok

A capsaicin kezelés után 5 nappal nem volt csökkenés az A és B sejtek számában a trigeminális ganglionokban a kontrollhoz képest. A teljes neuronális sejtszám 26.103 ± 1310 a kontroll állatokban ($n=4$) és 24.386 ± 1613 ($n=6$) a kezeltékben, ugyanilyen kis eltérés mutatkozott a B sejtek számában, 19.115 ± 1344 volt a kontroll és 18.277 ± 1322 a capsaicin-kezelt állatokban. A különbségek a két csoport között nem voltak szignifikánsak (I/1. ábra).



I/1. ábra: Trigeminalis ganglionok sejtszámainak alakulása 1 hetes kontroll és capsaicin kezelt állatokban

Három héttel a kezelés után a B sejtek számának csökkenését tapasztaltuk. A teljes sejtszám 28.138 ± 2136 volt a kontroll ($n=4$) és 22.218 ± 989 a capsaicin-kezelt csoportban. A B sejtek száma szignifikánsan nagyobb volt ($p=0.03$) a kontroll (20.348 ± 1609) mint a kezelt patkányoknál (12.369 ± 543). Az A sejtek számában nem találtunk eltérést.



I/2. ábra: Sejtszámváltozások a trigeminális ganglionban capsaicin valamint capsaicin + NGF kezelés után 3 héttel

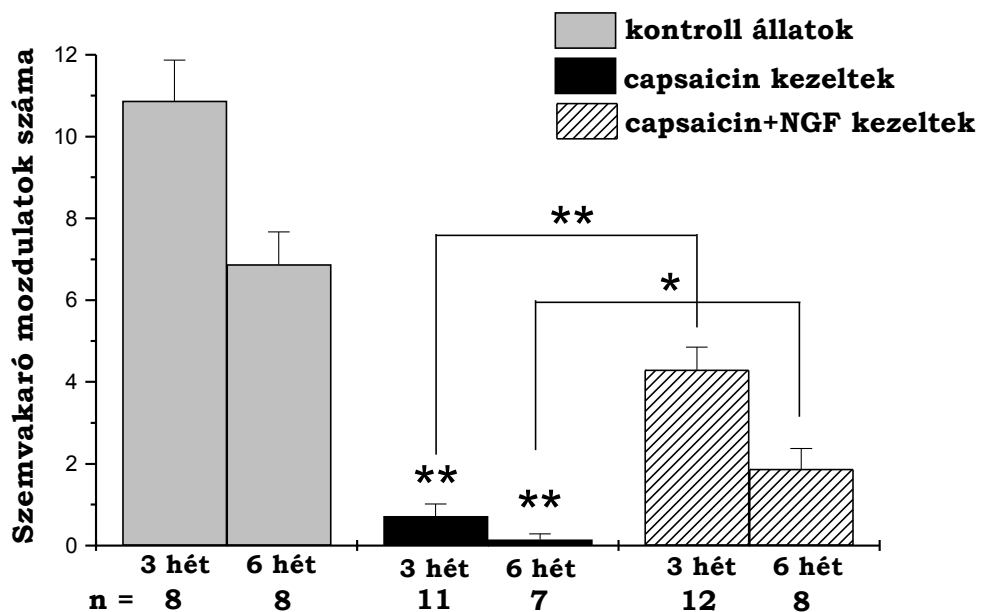
Habár az NGF kezelés nem hatott a capsaicin okozta ultrastruktúrális elváltozásokra, a sejtszámcsökkenést kivédte a capsaicin-kezelt állatok ganglionjaiban. A kontroll állatokban a B sejtek száma 20.348 ± 1609 volt 3 hetes korban, ugyanez capsaicin+NGF-kezelt állatoknál 21.496 ± 3948 ($n=5$, $p=0.4$) (I/2. ábra).

A sejtméretük a kezelés után 1 és 5 nappal nem mutattak különbséget a kontroll és capsaicin kezelt csoportokban, míg 3 és 6 héttel a capsaicin kezelés után a nagyobb méretek felé tolódtak el (I/3. ábra). Egy 6 hetes kontroll és egy capsaicin kezelt állat trigeminális ganglionjának A és B sejt megoszlását és a méretbeli eltolódást mutatja az I/4. ábra.

I/4. ábra: A és B sejtek megoszlása egy kontroll és egy capsaicin kezelt állat trigeminális ganglionjában.

Capsaicin és capsaicin+NGF kezelés hatása a kemonocicepcióra

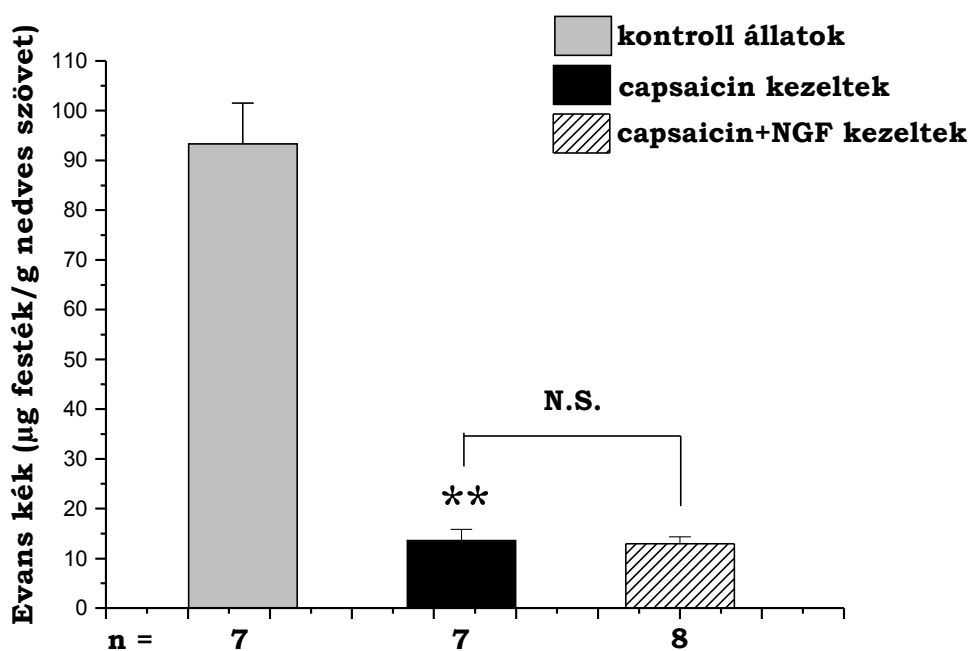
Szisztémás capsaicin kezelés deszenzitizációt okoz 3 és 6 hetes, újszülött korban capsaicinnel kezelt állatoknál. Capsaicin (10^{-5} g/ml fiziológias sóoldat) szembe cseppentése jóval kevesebb védekező törő mozdulatot eredményezett (0.86 ± 0.86 és 0.14 ± 0.11) mint a kontroll csoportokban (10.9 ± 1.9 és 6.9 ± 1.9) ($p < 0,001$). Míg a kontroll állatoknál minden esetben blepharospasmus jelentkezik, addig a kezelt állatoknál ez nem látható. A capsaicin+NGF kezelt 3 és 6 hetes állatoknál a mozdulatok száma 3.9 ± 0.8 és 2.1 ± 1 ($p < 0,05$ a 3 heteseknél és $p < 0,001$ a 6 heteseknél), sőt a blepharospasmus is visszatér néhány állatnál. A deszenzitizáció mértéke tehát kisebb azoknál az állatoknál melyek a capsaicin után NGF kezelést is kaptak mint azoknál, akik csak capsaicin injekciót kaptak (I/5. ábra).



I/5. ábra: Capsaicin szembecseppentéssel kiváltott kemonocicepció vizsgálata 3 és 6 hetes patkányoknál

Capsaicin és capsaicin+NGF kezelés hatása mustárolaj okozta plazma extravazációra

Újszülöttkori szisztémás capsaicin kezelés 85%-al csökkentette a plazma extravazáció mértékét a kezelt állatokban a kontroll állatokhoz képest ($p < 0,001$). A capsaicin+NGF-kezelt állatok esetén ez az érték hasonló volt, 86%. Az újszülöttkori NGF kezelés tehát nem befolyásolja a capsaicin kezelés plazma extravazációt gátló hatását (I/6. ábra).



I./6. ábra: Mustárolajjal kiváltott plazma extravazáció vizsgálata 6 hetes állatoknál

Megbeszélés

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok és a kvantitatív adatok azt bizonyítják, hogy újszülöttkori capsaicin előkezelés az érző ganglionok B sejtjeiben lassan kialakuló mitokondriumkárosodást és lassan bekövetkező sejtszámcsökkenést okoz.

Korábbi morfometriai vizsgálatokból már ismert, hogy az 50 mg/kg capsaicinnal történő újszülöttkori kezelés sejtszámcsökkenést okoz hátsó

gyöki ganglionokban, 3-6 hónappal az injekció után (Lawson, 1987, Arvidsson és Ygge, 1986, Mc Carthy és mtsai, 1999). A sejtszámcsökkenés mellett a myelinhüvely nélküli afferens rostok száma is kisebb lett (Jancsó és mtsai, 1977, Scadding, 1980, Lynn és mtsai, 1984, Jancsó és mtsai, 1987, Lawson és mtsai, 1987). Nagyobb, 100 mg/kg dózis esetén a myelinhüvelyes rostok száma (Nagy és mtsai, 1983) valamint az A sejtek száma is csökken (Lawson és Harper, 1984, Lawson, 1987). Ugyanakkor csak Otten és munkatársai (1983) közöltek olyan sejtszámolási adatokat, melyek két héttel a capsaicin kezelés után mutattak már sejtszámcsökkenést hátsó gyöki ganglionokban. Korábbi időpontban sejtszám meghatározások nem történtek. Régóta úgy tartják, hogy a capsaicin okozta sejtszámcsökkenéshez a B sejtek gyors nekrozisnak tűnő halála vezet, mely 30 percen belül bekövetkezik (Jancsó és mtsai, 1977, 1984, 1987). Egér kísérletekben a B sejtek lassabb degenerációját írták le, 2-3 nappal a kezelés után. (Hiura, 2000). A capsaicin neurotoxikus hatása az érződúcsejteken *in vitro* körülmények között is kimutatható, azonban csak nagy koncentráció esetén és akkor is csak hosszabb latencia idő után. Hátsó gyöki ganglionokból készített sejtenyészetekre adva a capsaicint 30 μ M koncentrációban, 24 óra múlva a sejtek mintegy 1.9%-a pusztul csak el (Chard és mtsai, 1995), pedig ez a dózis sokkal magasabb mint az, amit az 50 mg/kg-os subcutan injekció *in vivo* okoz a szenzoros neuronokban. A vérből, agyból és gerincvelőből vett mintákban 0,4-0,5 μ g/g-os maximumot ért el a mennyisége 5 órával a kezelés után (Saria és mtsai, 1982). Sugimoto és munkatársai (1998, 1999) újszülöttkori capsaicin kezelés (50 mg/kg, s.c.) után 12-48 órával apoptotikus neuronokat írtak le, de gyors, a korábban leírt neurotoxikus sejthalálnak nem találtak nyomát. Felnőttkori előkezelés során apoptózisra utaló jeleket nem találtak. Ezek a tények nem támasztják alá azt a feltételezést, mely szerint a capsaicin gyors, neurotoxikus sejthalált okoz.

Kísérleteinkben 24 órával a capsaicin előkezelés után apoptotikus sejteket nem találtunk, viszont ozmiofil, nekrotikus sejtek előfordultak, melyek sejtmagja és sejtorganellumai károsodottak, ahogy azt korábban leírták patkányban (Jancsó és mtsai, 1977, Jancsó és Király, 1981) és egérben (Hiura és Ishizuka, 1989, Hiura, 2000). Meg kell említeni azonban,

hogy a capsaicin subcutan injekciója után apnoe, bradykardia és hipotenzio lép fel, melyet az állatok mesterséges lélegeztetés nélkül nem élnek túl. Feltehető, hogy a mesterséges lélegeztetés ellenére olyan komoly ischémia alakul ki, mely néhány sejt esetében akár apoptotikus akár nekrotikus sejthalálhoz vezet (Lipton, 1999). Öt nappal a kezelés után azonban nem találtunk szignifikáns sejtszámcsökkenést. Tehát a három hét után jelentkező redukción a B sejtek számában nem tekinthetjük korai, akut sejthalál következményének. Korábbi irodalmi adatok sem számolnak be olyan sejtszámcsökkenésről, mely biztosan az akut sejtelpusztulásnak tulajdonítható.

A későn jelentkező sejthalált valószínűleg a perifériás és centrális idegvégződések degenerálódása következtében fellépő NGF felvétel hiánya okozta újszülöttkori előkezelés esetén. Felnőttkori előkezelés után ez a hatás nem jár együtt sejtelpusztulással. Az NGF nélkülözhetetlen a nociceptív afferensek prenatális és korai posztnatális fejlődési periódusában (Mendell, 1999). Ha újszülött állatokban megvonjuk a sejtektől az NGF-t, akkor az a sejtek pusztulásához vezet. Szisztémás capsaicin kezelés felnőtt állatokban az axonok centrális és perifériás terminálisainak pusztulását okozza (Szolcsányi és mtsai, 1990, Holzer, 1992, Winter és mtsai, 1993). Hasonló károsodás újszülött állatokban megakadályozza az NGF transzportját az axonokból a sejttestbe, így azok elpusztulhatnak. Hátsó gyöki ganglionsejtek számának csökkenése capsaicin kezelés után kivédhető volt NGF adásával (Otten, 1983). Mivel az NGF amellet, hogy fontos a sejtek túlélése szempontjából, fokozza a sejtek capsaicin-érzékenységét is (Winter és mtsai, 1988, Shu és Mendell, 1999), így mi a kísérletek során nem egyszerre adtuk a capsaicint és NGF-et a patkányoknak mint Otten és munkatársai, hanem egy nappal később kezdtük az NGF adagolását. Így nem befolyásoltuk a capsaicin okozta korai ultrastruktúrális változások kialakulását.

A capsaicin kezelés hatására a nociceptív primer afferensek hosszú ideig elhúzódó funkcionális zavaraival párhuzamosan a mitokondriumok károsodása is megfigyelhető, ahogy azt leírták korábban felnőtt állatokban (Joó és mtsai, 1969, Szolcsányi és mtsai, 1975, Chiba és mtsai, 1986), *in vitro* capsaicin adás után (Marsh és mtsai, 1987) valamint szisztémás RTX

hatására (Szolcsányi és mtsai, 1990). Kalciummentes környezetben hasonló változás nem történik (Marsh és mtsai, 1987). A capsaicin megnyitva a VR1 receptor kation csatornáját megnöveli az intracelluláris kalciumion-koncentrációt (Bevan és Szolcsányi, 1990, Caterina és mtsai, 1997), a mitokondriumok kalciummal telítődnek, ez pedig struktúrális károsodáshoz vezet (Dedov és Roufogalis, 2000). Megválaszolatlan az a kérdés, hogy ez miért nem vezet azonnali sejtpusztuláshoz, vagy miért nem követi restitúció. Ilyen mitokondriumokat hetekkel a kezelés után is láthatunk. Az NGF kezelés a sejtszámcsökkenést megakadályozta, de a mitokondriumok dezorganizációjára nem volt hatással. Ezen a ponton további vizsgálatok rávilágíthatnának a mitokondriumok szerepére a sejt élelciklusában, valamint a VR1 aktiváció által indított molekuláris biológiai történésekben.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az újszülöttkori capsaicin kezelés a felnőttkori kezeléshez hasonlóan hosszú ideig elhúzódó szelektív ultrastruktúrális és funkcionális változásokat okoz a B-típusú érződúcsejtekben. Kvantitatív morfolometriai adatokkal nem támasztható alá a capsaicin korai neurotoxikus hatása. A B-típusú neuronok szignifikáns csökkenése csak három hét után mutatható ki és NGF adással kivédhető. NGF-adás antagonizálja a capsaicin-adással kiváltott antinociceptív hatást de nem védi ki a capsaicin-adással kiváltott neurogén gyulladásgátló hatást és a több hétig tartó mitokondriumduzzadást.

II. A CAPSAICIN ÉS ANANDAMID HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNY TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJT-TENYÉSZETEN INTRACELLULÁRIS KALCIUMIONSZINT-MÉRÉSSEL

Bevezetés

A klónozott VR1 capsaicin receptoron keresztül a capsaicin vagy forró inger a sejtbe befelé irányuló kationáramot hoz létre, melynek fontos összetevője a kalcium ion. A capsaicin hatás létrejöttéhez nincs szükség másodlagos hirtívő rendszer közreműködésére. A kalciumionok beáramlása kalcium-szenzitív enzimeket stimulál, mely intracelluláris mediátorok, mint például cGMP, szintjének emelkedéséhez vezet (Wood és mtsai, 1989, Bevan és Szolcsányi, 1990). Az extracelluláris kalcium ionok hatását a capsaicin válasz kialakulására többen vizsgálták. Megállapították, hogy az extracelluláris kalcium jelenléte szükséges a deszenzitizáció kialakulásához (Holzer, 1991, Szolcsányi, 1993). A kalciumionok eltávolítása az extracelluláris térből a deszenzitizáció mértékének csökkenéséhez vezet (Liu and Simon, 1996). Ez a jelenség a *Xenopus* oocytákban expresszált klónozott VR1 capsaicin receptoron is kimutatható volt. Extracelluláris kalcium hiányában a VR1 nem, vagy csak kis mértékben mutatott tachyphylaxiát ismételt capsaicin alkalmazásakor. Valószínűsíthető, hogy a capsaicin hatására megnövekvő intracelluláris kalciumionszint biokémiai folyamatok sorozatát indítja el, melyek közös eredménye a VR1 receptor deszenzitizáció (Szallasi és Blumberg, 1999).

A VR1 receptor természetes aktivátorai, valamint szintetikus és a természetben is előforduló VR1 agonisták mellett felmerült a cannabinoid és a capsaicin-érzékeny rendszer kapcsolata. Az endocannabinoid anandamid tenyésztett endothél sejteken kalciumion-akkumulációt okoz, melyet a szelektív CB1 receptor antagonistá SR 141716A blokkolni tudott (Fimiani 1999). Az anandamid képes csökkenteni a capsaicin által kiváltott CGRP felszabadulást a hátsó gyöki ganglionból a nociceptív afferensek CB1 receptorain keresztül (Calignano és mtsai, 1998, Richardson és mtsai, 1998).

Ugyanakkor sikerült igazolni az anandamid izgató hatását a VR1 receptort expresszáló HEK293 sejteken, ahol befelé folyó áramot váltott ki, melyet a capsaicin antagonistá capsazepin kivédett (Zygmunt és mtsai, 1999, Smart és mtsai, 2000). Izolált ér-preparátumon az anandamid vazodilatációt hoz létre CGRP felszabadításán keresztül, mely szintén blokkolható volt a capsaicin antagonistá capsazepinnel (Bevan 1992, Szallasi és Blumberg, 1999). A neuronokban keltett anandamid válasz modulálására a kompetitív CB1 antagonistá SR 141716A (Rinaldi-Carmona és mtsai, 1994) illetve antinociceptív hatású agonisták, például a WIN 55212-2 és a Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Rinaldi-Carmona és mtsai, 1995) használatosak.

A CB1 receptorok jelenlétét kimutatták központi és perifériás idegrendszerben, a capsaicin érzékeny rostokon is (Chard és mtsai, 1995, Farquhar-Smith és mtsai, 2000). Tenyésztett hátsó gyöki ganglionsejtekben a CB1 és VR1 immunpozitív sejtek nagymértékű átfedéséről számoltak be (Ahluwalia és mtsai, 2000).

Kutatócsoportunk egy új kísérleti módszert állított be, az intracelluláris kalciumionszint mikrofluorimetriás mérését patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészetben. Doktori munkám része volt a sejttenyésztési technika és intracelluláris Ca^{2+} -mérés módszereinek beállítása. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az anandamid szenzoros neurontenyészetben is képes-e kalciumion-akkumulációt létrehozni, valamint azt, hogy az anandamid hatásában a CB1 cannabinoid receptoriális gátlás vagy a VR1 capsaicin receptoron keresztül kifejtett kalciumakkumulációt aktiváló hatás mutatható ki natív érződúcsejteken.

Módszerek

1. Patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészet készítése: 2-5 napos Wistar patkányokat éteres altatás mellett dekapitáltuk, kétoldali trigeminális ganglionjukat steril foszfát pufferben (PBS) kipreparáltuk és 1 mm³-es darabokra vágtuk. A gangliondarabokat 40 percig 2 % kollagenázt tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett. Ezután

deoxiribonukleáz I-et tartalmazó PBS-ben inkubáltunk 8 percen keresztül. Triturálás után a sejteket steril 24 lukú tenyésztőedényekbe helyeztük, melyek fenekén poly-D-lysinnel előkezelt üveg lemezek voltak. A tenyésztő médium a következő összetevőkből állt: 180 ml Dulbecco's-Modified Eagle Medium (D-MEM), 5% ló szérum, 5% újszülött kecske szérum, 5% BSA, 100 µl penicillin, 100 µl sztreptomycin. A tápoldathoz 200 ng/ml NGF-t adtunk, a tápoldatot kétnaponta cseréltük, a kísérletekhez 3-8 napos tenyészeteket használtunk.

2. Intracelluláris kalciumionszint-mérés fluoreszcens módszerrel: A 3-8 napos tenyészeteket 1 µM fura-2-acetoxy-metilészter (AM) fluoreszcens kalcium-indikátor festéket tartalmazó oldatba helyeztük át, melynek összetétele a következő (mM-ban): NaCl, 122; KCl, 3.3; CaCl₂, 1.3; MgSO₄, 0.4; KH₂PO₄ 1.2; HEPES, 25; glükóz, 10; pH 7.3. A festékkal való inkubálás 15 percig tartott 37°C-on, mely során a festék akadálytalanul jut át a sejtmembránon, a sejt belsejében az észterázok lehasítják a róla az észtert, és így az képes lesz a szabad kalciumionokat megkötni, viszont a membránon így nem tud átjutni, sejten belül marad. Az inkubálás után 20 perces mosás következett tápoldatban, melynek összetétele a következő (mM-ban): NaCl, 160; KCl, 2.5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; glükóz, 10; pH 7.3. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük Olympus BX50WI fluoreszcens mikroszkóppal. A sejtekre folyamatosan friss tápoldatot áramoltattunk egy kb. 150 µm átmérőjű csövön keresztül. A fluoreszcens képet egy 20×-os nagyítású vízimmerziós objektív és egy számítógéphez csatlakoztatott digitális kamera (CCD, SensiCam PCO) segítségével rögzítettük. Egy látótéren belül 3-12 sejten tudtunk egy időben méréseket végezni. A méréshez igyekeztünk kis (<25 µm) átmérőjű sejteket kiválasztani. Egy sejt kb 800-1500 pixelt tesz ki a képernyőn. A sejteket alternálva 340 és 380 nm hullámhosszú fényel világítottuk meg egy monochromator (Polychrome II, Till Photonics) segítségével, az emittált fényt 510 nm hullámhosszúságon mértük. A két hullámhosszon gerjesztett fluoreszcencia intenzitás arányát (ráciometrikus érték, $R=F_{340}/F_{380}$) az idő függvényében az Axon Imaging Workbench 2.2 software-el mértük, a kapott függvényeket a Microcal Origin

6.0 software segítségével értékeltük. A sejtmentes területekről nyert adatok felhasználásával háttérlevonást végeztünk.

3. *Capsaicin, KCl és anandamid hatás vizsgálata.* A sejtekre folyamatosan tápoldat áramlott, e mellett még 3 másik anyagot tudtunk tesztelni a kísérleti elrendezésben. Ez lehetővé tette, hogy a tápoldatot rövid időre, pár másodpercre kicseréljük a tesztelni kívánt anyagra, melyről mivel nagyon közelről, közvetlenül a sejtekre áramlott tudjuk, hogy pontosan milyen koncentrációban érte el a sejteket. A különböző kísérletekben eltérő ideig alkalmaztuk az anandamidot, capsaicint és KCl-t, ezeket az eredmények leírásakor ismertetem a könnyebb áttekinthetőség érdekében. A capsaicint 100 nM, 330 nM 1 μ M koncentrációban, az anandamidot 200 nM és 10 μ M koncentrációban használtuk. A KCl-dal végzett kísérletek esetén a tápoldat NaCl koncentrációját lecsökkentettük, a KCl koncentrációját 50 mM-ra növeltük.

4. *Az anandamid capsaicin-választ gátló hatásának vizsgálata.* Az első capsaicin válasz kiváltása után a tápoldat áramlását leállítottuk, és a kamrába pipettával anandamidot adtunk, úgy, hogy ott annak végső koncentrációja 200 nM legyen. Az inkubáció sötétben zajlott 5 percig, hogy az anandamid lebomlását akadályozzuk. Ezután elindítottuk a tápoldat áramlását, és fél percen belül elvégeztük a második capsaicin tesztet is, a két eredményt összehasonlítva, a másodikat az elsőhöz viszonyítva következtettünk a gátlás hatásfokára.

5. *Az SR 141716A szelektív CB1 receptor antagonistá hatása az anandamid válaszra.* Az SR 141716A tesztelése előtt két alkalommal adtunk anandamidot (200 nM, 5 másodperc) a sejtekre, majd a tápoldat áramlását leállítottuk 5 percre, és a kamrába pipettával SR 141716A-t adtunk, hogy ott a végső koncentráció vagy 300 nM vagy 10 μ M legyen. Ezután az tápoldat áramlását újraindítottuk, a harmadik anandamid tesztet fél percen belül elvégeztük, majd a második és harmadik teszt eredményét hasonlítottuk össze, az eredményeket az első válaszhoz viszonyítottuk.

6. Az SR 141716A szelektív CB1 receptor antagonistá hatásának vizsgálata az anandamid capsaicin-választ gátló hatására. Ebben az esetben a sejtek egy csoportja 3 ízben ismételt (2 másodperces) 330 nM koncentrációjú capsaicint kapott. Ez volt a kontroll csoport. A sejtek másik csoportjánál a második és a harmadik capsaicin adás között 200 nM-os anandamid inkubálást alkalmaztunk (4. pont). A sejtek harmadik csoportja esetén az anandamid inkubálás mellett egyidőben 300 nM SR 141716A-t is a kamrába juttattunk.

Eredmények

Capsaicin-érzékeny sejtek identifikálása

A kísérletek első fázisában azonosítottuk a capsaicin-érzékeny sejteket, a fluoreszcencia arány (R) megnövekedése alapján (*III/1. ábra*) (Csak azokat a sejteket vettük figyelembe ahol az R érték elérte vagy meghaladta a 0.1-et). A sejtek 47,4%-a (302-ből 143) válaszolt intracelluláris kalciumionszint növekedéssel 100 nM capsaicin alkalmazásakor, 45.3%-a (75-ből 34) 330 nM capsaicin, 70.4%-a (71-ből 50) 1 μ M capsaicin sejtekre juttatására. A capsaicin adás mindig 5 másodpercig tartott, mely azonban a válaszok kinetikája és időtartama szempontjából jelentős eltéréseket okozott. Nagyjából egyforma gyakorisággal észleltünk rövid tranzienst, valamint egy kezdeti gyors fázist követő hosszú platós résszel rendelkező formákat. Kvantitatív értékelésre a kalcium-válaszok maximumait használtuk, mely az első 20-30 másodpercben mindig kialakult. Az átlag R érték 100 nM capsaicin esetén 0.293 ± 0.32 volt, 330 nM hatására 0.683 ± 0.23 , 1 μ M capsaicin alkalmazásakor pedig 0.758 ± 0.24 értéknek adódott.

Capsaicinre nem válaszoló sejtek egy csoportján (n=20) 50 mM KCl-t adva 18 sejtben figyeltünk meg fluoreszcencia arány növekedést. Ez az adat bizonyítja, hogy a capsaicin-válasz hiánya nem jelenti a sejtek károsodott állapotát, reakcióra való képtelenségét, hanem a receptor molekulák hiányának tudható be.

II/1. ábra: A capsaicinnel kiváltott intracelluláris kalciumion koncentráció változásainak jellegzetes típusai. Az x tengely az időt, az y tengely fluoreszcencia arány értékét (R) mutatja. Az egyes regisztrátumok különböző sejtekre adott első capsaicin adások hatását mutatja. Mindenhol feltüntettük az alkalmazott koncentrációt is.

Anandamid gátló hatása a capsaicin válasz kialakulására

Két másodpercig adott 100 nM capsaicinnel kiváltott R érték növekedéssel identifikáltuk a capsaicin-érzékeny neuronokat. Ezután meghatároztuk 5 másodpercig adott 330 nM capsaicin hatását, mely kontroll körülmények között $R=0.242\pm 0.20$ -nek adódott. Ha a 330 nM capsaicin adása előtt 200 nM-os anandamiddal inkubáltuk a sejteket, a fluoreszcencia növekedés körülbelül 20%-ára csökkent ($R=0.04\pm 0.07$ ($n=14$)). Az anandamid tehát nanomoláris koncentrációban gátolta a második capsaicin reakció kialakulását, a kalciumion beáramlását a sejtbe.

Anandamid által kiváltott intracelluláris kalciumionszint emelkedés

Kísérleteinkben először igazoltuk, hogy az anandamid képes szenzoros neurontenyészetben a capsaicinhez hasonló intracelluláris kalciumionszint emelkedés kiváltására (II/2. ábra). Anandamid alkalmazása 100 sejten a következő eredményeket hozta. A sejtek 17%-a válaszolt intracelluláris kalciumionszint növekedéssel 200 nM anandamid használatkor ($R=0.2\pm 0.13$, $n=17$). Ezeket a sejteket is beleértve, csupán a sejtek 27%-ában nőtt meg a kalciumionszint 10 μ M anandamid alkalmazásakor ($R=0.16\pm 0.12$, $n=27$). Mindkét koncentrációt 10 másodpercig alkalmaztuk a sejteken, a válaszok az anandamid esetében is változó időbeli lefutásúak voltak. A capsaicinre adott válaszokhoz hasonlóan, rövid tranziens válaszok és hosszabb, platós reakciók egyaránt előfordultak (II/2b,e. ábra).

Anandamid- és capsaicin-érzékeny sejtek megoszlása a sejttenyészetben

Rövid ideig, 2 másodpercig alkalmaztuk a három használt capsaicin koncentráció közül az egyiket a sejteken. Így azonosítani tudtuk a capsaicin-érzékeny neuronokat anélkül, hogy teljes deszenzitizáció kialakult volna. 5 percel később a capsaicin-érzékeny sejtek közel 50%-a válaszolt 10 μ M anandamidra kalciumionszint növekedéssel. Az átlag R érték $R=0.36\pm 0.35$ volt, ha előtte 100 nM capsaicint használtunk (38 capsaicin-érzékeny sejt közül 17 sejt reagált), $R=0.36\pm 0.25$ volt ha előtte 330 nM capsaicint alkalmaztunk ($n=13/38$) és $R=0.197\pm 0.16$ ($n=7/17$) értéket kaptunk

amennyiben 1 μM capsaicint használtunk előtte. Az R értékek jól mutatják, hogy 2 másodpercig tartó, rövid expozíciónál csak 1 μM -os koncentráció alkalmazása után jött létre részleges deszenzitizáció. Ezután egy 5 perces mosási periódus következett, majd újra capsaicint adtunk a sejteknek. A kontaktusidőt ekkor 10 másodpercre növeltük. A sejtek 39.4%-a reagált capsaicinre azok közül, amelyek anandamidra is reagáltak, a sejtek 13%-a csak capsaicinre reagált, a sejtek 10.5%-ában a capsaicin hatása eltűnt az anandamid okozta kalciumionszint-növekedés után (II/2. ábra).

Anandamid hatása szelektív CB1 receptor antagonistá SR 141716A jelenlétében

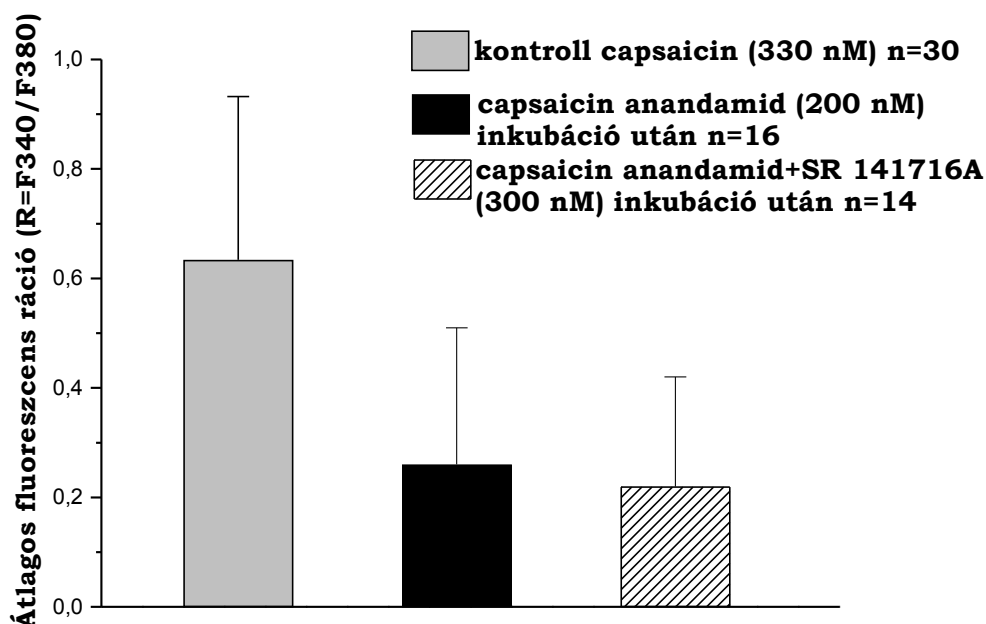
Anandamid (200 nM, 5 másodpercig) 5-10 percenként ismételt adásakor, három tesztelés után a válasz hatáscsökkenés nélkül reprodukálható volt. A CB1 antagonistát a második és a harmadik anandamid teszt között adtuk a sejt kultúrához. A kisebb koncentrációjú SR 141716A-val (300 nM) történő 5 perces inkubáció után az anandamid adásakor észlelhető intracelluláris kalciumionszint-növekedés nem különbözött jelentősen az antagonistá előtt adott anandamid hatásától (n=18). 10 μM SR 141716A adását követően 27 sejtből 12 sejtben figyeltük meg a válasz növekedését. (Az első anandamid válasz esetén $R=0.385\pm 0.161$, a másodiknál $R=0.328\pm 0.168$, az SR 141716A alkalmazása után a harmadik válasznál $R=0.426\pm 0.158$.) Vizsgálataink tehát azt bizonyítják, hogy a gátló CB1 receptorok blokkolása SR141716A-val a sejtek mintegy 50 %-ánál fokozta az anandamiddal kiváltott kalcium-választ jelezve, hogy a sejtek ezen csoportjában a CB1 receptorális gátlás és VR1 receptorális izgatás egyaránt szerepet játszik. Érdekes, hogy a sejtek másik csoportjában ez a CB1 receptorális gátlás nem volt megfigyelhető és 7 esetben hatáscsökkenést figyeltünk meg, 6 esetben pedig a válasz nem volt kiváltható. További vizsgálatot igényel annak kiderítése, hogy ezeknél a sejteknél a VR1 receptor deszenzitizációja milyen szerepet játszik a hatás csökkenésében.

II/2. ábra: Intracelluláris kalciumion-koncentráció növekedés tenyésztett trigeminális ganglionsejtekben. **a-c**: egy sejt válasza capsaicinre (**a**, 330 nM, 2 mp), majd 5 perces szünet után anandamidra (**b**, 10 μ m, 5 mp), és végül ismét capsaicinre (**c**, 330 nM, 10 mp), **d-e**: Két szomszédos sejt válasza capsaicinre (**d**, 100 nM, 2 mp), majd anandamidra (**e**, 10 μ m, 5 mp). Látható, hogy a capsaicinre válaszoló két sejt közül csak az egyik volt érzékeny anandamidra (5 perc múlva ismételt anandamid adásakor az eltérő válaszkészség reprodukálható volt-**eI**), **f**: ismételt capsaicin adásakor az anandamid-inszenzitív sejt továbbra is reagál capsaicinre. Függőleges jel: R=0,2, vízszintes jelek: capsaicin és anandamid alkalmazásának hossza, x tengely: idő másodpercben

Az anandamid capsaicin-választ gátló hatása SR 141716A szelektív CB1 receptor antagonistája jelenlétében

A kontroll csoportban tehát a sejtek 3 ízben ismételt (2 másodperces) 330 nM koncentrációjú capsaicint kaptak. A sejtek másik csoportja esetében a második és a harmadik capsaicin adás között 5 perces 200 nM-os anandamid inkubálást alkalmaztunk. A sejtek harmadik csoportja esetén az anandamidos inkubálással egyidőben 300 nM SR 141716A-t is adtunk a kamrába.

A II./4. ábrán látható, hogy 200 nM anandamid jelentősen gátolta a capsaicinnel kiváltott kalciumionszint emelkedést. A gátló hatás nagysága CB1 antagonistája jelenlétében is változatlanul megfigyelhető. Ez az adat arra utal, hogy a VR1 receptorialis deszenzitizáció kialakulását az anandamid CB1 receptort izgató hatása nem befolyásolja.



II./4. ábra: Az anandamid capsaicin-választ gátló hatása SR 141716A szelektív CB1 receptor antagonistája jelenlétében

Megbeszélés

Az anandamid mint endocannabinoid izgatja a CB1 receptorokat és ez gátolja a szenzoros neuronok aktiválhatóságát és analgetikus hatását (Calignano és mtsai, 1998, Richardson és mtsai, 1998). Újabb eredmények alapján az anandamid CB1 agonista gátló hatásán kívül a VR1 receptor agonistájaként depolarizációt is kivált a szenzoros neuronokon (Zygmunt és mtsai, 1999, Smart és mtsai, 2000).

Elsőként bizonyítottuk, hogy az anandamid fura-2-vel feltöltött tenyésztett szenzoros neuronokban tranziens fluoreszcens növekedést, kalciumion-akkumulációt vált ki. Ez a natív sejteken kapott megfigyelés összhangban áll azokkal az eredményekkel, melyek anandamiddal kiváltott befelé folyó ionáramról számolnak be VR1-et expresszáló HEK293 sejteken (Zygmunt és mtsai, 1999, Smart és mtsai, 2000). A reakció kinetikája és időbeli lefutása az egyes sejteknél eltérést mutatott, de hasonló jellegű volt mint a capsaicin tesztek során kapott eredmények. Az anandamid VR1 aktivációval kiváltott kalciumion-beáramlást (Bevan és Szolcsányi, 1990) előzetes aktiváció után, vagy anélkül gátolni is képes, mivel nanomoláris koncentrációban képes a capsaicin hatását antagonizálni, vagy anandamid jelenlétében gátolt a capsaicin reakció kialakulása. Ez a gátló hatás az anandamid parciális VR1 receptor antagonistá hatásával, vagy az anandamid kiváltotta cannabinoid receptor aktivációjával is magyarázható. A capsaicin-érzékeny idegvégződésekből az anandamid által kiváltott CGRP-felszabadulás gátlása szintén az anandamid VR1 receptoriális antagonizáló hatására utal (Richardson és mtsai, 1998, Szolcsányi, 2000). A szelektív CB1 receptor antagonistá SR141716A-val végzett vizsgálataink bizonyították, hogy a receptorok blokkolása a sejtek mintegy felénél megnövelte az anandamiddal kiváltott kalcium-választ. A gátlásban tehát a CB1 receptor izgatásának szerepét sikerült kísérletesen bizonyítanunk a VR1 receptoriális izgatás mellett is, ami a CB1 és a VR1 receptorok koexpresszióját mutatja egyes neuronokban. Találtunk azonban olyan sejteket is, ahol az antagonistá adása után az anandamid válasz gátlása volt látható, CB1 antagonistá jelenlétében is. Így a VR1 parciális antagonistá hatás szerepe is

feltételezhető. Más kutatócsoportok is hasonló diverzitásról számoltak be (Poling és mtsai, 1996, Calandra és mtsai, 1999, Vasques és Lewis, 1999).

III. ÚJSZÜLÖTTKORI ANANDAMID KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNY TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJTEKEN ÖSSZEHASONLÍTVA A CAPSAICIN KEZELÉS KÖVETKEZMÉNYEIVEL.

Bevezetés

A II. fejezetben leírt kísérletek értékelésekor felmerült, hogy az anandamid hatására kialakuló válaszban a VR1 receptor aktiválása valószínűsíthető. A capsaicin előkezelés hatásairól, a B sejtek ultrastrukturális károsodásáról, a mitokondriumok elváltozásáról, hetekkel később jelentkező sejtszámcsökkenésről, valamint a hosszan elküzdő deszenzitizáció jelenségéről már esett szó az első fejezetben. Érdekes volt tehát megvizsgálni azt, hogy vajon az anandamidnak vannak-e a capsaicinhez hasonló morfológiai hatásai a szenzoros ganglionok sejtjein és okoz-e hasonló, hetekig tartó antinociceptív hatást. Ezek a jelenségek újabb bizonyítékok lennének arra, hogy az anandamid a VR1 receptor endogén ligandja és érdekes példáját képezhetnék annak, hogy egy endogén ligand is képes kiváltani a capsaicinhez hasonlóan tartós funkcionális és morfológiai hatásokat.

Módszerek

1. Újszülött patkányok kezelése anandamiddal: Két napos Wistar patkányokat kezeltünk anandamiddal 1 mg/kg dózisban (s.c.), úgy ahogy korábban a capsaicin előkezelést végeztük (Jancsó és mtsai, 1977). Az injekciót nem követte sem asphyxia, sem apnoe, melyek a capsaicin kezelés velejárói. A kontroll állatokat az anandamid oldószerét kapták (1% etanol fiziológias sóoldatban).

2. Perfúzió: A ketaminnal elaltatott patkányokat transzkardiálisan 0.1 M-os foszfát pufferrel (PB, pH=7.4), majd 4%-os paraformaldehid és 1%

glutáraldehid keverékével (0.1 M PB-ben) perfundáltuk vagy egy nappal az anandamid kezelés után, tehát 3 napon, vagy 1, 2, 3, 6, 10, 12, 14 illetve 20 hetes korokban.

3. *Kombinált VR1 immun-elektronmikroszkópia:* Két 6 hetes, anandamiddal kezelt Wistar patkányt transzkardiálisan 0.1 M-os foszfát pufferrel (PB, pH=7.4), majd 4%-os paraformaldehiddel perfundáltunk. Ezután a trigeminális ganglionokat kimetszettük, azokat 1 órán keresztül posztfixáltuk a paraformaldehidben. Két órára 15%-os szukróz oldatba (0.1 M PB-ben) majd éjszakára 30%-os szukróz oldatba helyeztük a gangliondarabokat. A perfúziót követő napon a ganglionokat a szukróz oldatból kivettük, majd egy Eppendorf csőbe helyezve folyékony nitrogénben lefagyasztottuk őket. A felolvadás után ezt még egyszer megismételtük. Ezután fagyasztó mikrotómmal 15 µm vastagságú metszeteket készítettünk a ganglionokból. TRIS pufferben (pH=7.6) történő mosás után a metszeteken háttérgátlást végeztünk (Vector P6200 Universal Kit), majd egy éjszakán át szobahőmérsékleten TRIS pufferben (pH=7.6) hígított VR1 antitesttel inkubáltuk (1:500, Chemicon). Másnap Tris pufferes mosás után 2 órás inkubálás következett a szekunder antitesttel (Vector P6200 Universal Kit), majd 2 órás inkubálás avidin-biotin -peroxidáz komplexben (Vector P6200 Universal Kit). Újabb mosást követően DAB-os hívást végeztünk. A reakciót fénymikroszkóp alatt figyeltük, az immunpozitív sejtek megjelenése után állítottuk le 0.1 M Tris pufferben. A metszetek ezután kerültek 2 %-os glutáraldehidbe 1-2 órára. Ezután rutin elektronmikroszkópos beágyazás történt az I. fejezetben ismertetett módon úgynevezett „flat embedding” módszerrel. Félvékony metszetekben jól láthatók voltak a jelölt sejtek, melyek VR1 immunpozitívak, ezeket a sejteket kerestük meg az ultravékony metszeteken az elektronmikroszkópban.

4. *Elektronmikroszkópos vizsgálatok:* A perfúzió után minden korcsoportból 2 kontroll és 2 kezelt állat trigeminális ganglionját, valamint a 3 hetes állatok hippokampuszát kivettük, és szintén az I. fejezetben

ismertetett módon processzáltuk, az ultravékony metszeteket JEOL 1200 elektronmikroszkóp alatt vizsgáltuk át.

5. *Módosított tail-flick teszt:* A kezelt és kontroll állatokkal 3-14 hetes korukig hetente végeztük el a következő tesztet. Az állatok farkát olyan vízfürdőbe lógattuk, melynek hőmérsékletét termosztát és vízcirkuláció segítségével $\pm 0.2^\circ\text{C}$ -os pontossággal állítottuk be. A víz hőmérsékletét 45°C -tól fokenként emeltük maximum 53°C -ig. A nociceptív küszöb hőmérsékletet úgy állapítottuk meg, hogy meghatároztuk azt a minimális hőmérsékletet, melynél az állat 5 másodperc alatt a farkát a vízből kirántotta. Küszöb hőmérsékletnél magasabb hőmérsékleten tesztelést nem végeztünk. Ezen módosítás segítségével a klasszikus tail-flick teszttel ellentétben nem reakciólatencia időt, hanem a nociceptív hőküszöböt lehetett mérni, ami a capsaicin hatásainak vizsgálatánál alkalmasabb módszernek bizonyult korábbi vizsgálatok alapján (Szolcsányi, 1990).

Eredmények

Anandamid kezelés hatása a trigeminális ganglionsejtekre

Huszonnégy órával a kezelés után a ganglionsejteken nem tapasztaltunk morfológiai eltéréseket, ellentétben a capsaicin kezelés ($50\ \mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) után tapasztaltakkal, ahol nekrotikus B sejtek is láthatunk ebben az időszakban. Megjegyzésre méltó, hogy anandamid adás nem váltott ki apnoe választ a patkányokon. Egy héttel az előkezelés után a kis, sötét, B sejtekben található mitokondriumok károsodása, a kriszták dezorganizációja figyelhető meg. A károsodás még nem érinti a sejt összes mitokondriumát. A két hetes állatokban ugyanilyen mértékű károsodás volt megfigyelhető, bár ezekben a sejtekben már több mitokondrium volt érintett (*III/2a. kép*). Az egy-két hetes kezelt állatok ganglionjából készített félvékony metszetek még nem különböznek a hasonló korú kontrollokból készített metszetektől. A három hetes állatok esetében az érintett sejtek szinte összes mitokondriuma károsodott. A kriszták némelyikben teljesen eltűnnek, a mitokondriumok

mérete megnő, duzzadt (*III/2b. kép*) Ugyanazok a világos, buborészerű foltok láthatók a mitokondriumok helyén a félvékony metszetekben mint capsaicin kezelés után 3 héttel (*III/1. kép*). A jelenséget ebben a sorozatban is 20 hétig vizsgáltuk mint ahogy a capsaicinnel kezelt állatok esetében. Az eredmény is ugyanaz volt, a sérült B sejtek végig megtalálhatók a ganglionokban. Ugyanúgy épek a világos, A sejtek és a szatellita sejtek. Az érintett, kis sejtekben a mitokondriumokon kívül az összes sejtalkotó ép, duzzadásnak, lézióknak nincs nyoma a nucleusban, endoplazmás retikulumban, Golgi apparátusban. Sem apoptózisra, sem nekrosisra utaló jelek nem detektálhatók egyik korcsoportban sem.

III/1. kép: Három hetes, újszülött korban anandamiddal kezelt patkány trigeminális ganglionjának félvékony metszetéről készült kép. Az anandamid előkezelés a capsaicinhez hasonlóan a B sejteket (**B**) érinti, az A sejtek (**A**) épek. Sötét nyíl jelzi a károsodott sejteket. Jel: 10 µm.

III/2. kép: Újszülött korban anandamiddal előkezelt 2 hetes (**A**) és 3 hetes (**B**) patkány trigeminális ganglionjának elektronmikroszkópos képe., A károsodás itt is a mitokondriumokat érinti (**m**), míg a többi sejtalkotó (**G, ER**) és a nucleus (**N**) ebben az esetben is ép. Jel: 0.5 μm

Anandamid kezelés hatása a hippocampusz sejtjeire

Három héttel a kezelés után, amikor a trigeminális sejtekben a mitokondrium károsodása már szembetűnő, a hippocampusz fő sejtjei és interneuronjai egészségesnek tűnnek elektronmikroszkópban. Sem a gyrus dentatusban, sem az Ammon szarvban nem láttunk elváltozásokat.

VR1 immun-elektronmikroszkópia

A 6 hetes előkezelt állatok trigeminális ganglionsejtjeinek körülbelül 35-40%-a volt VR1 immunpozitív (*III/3. kép*). A jelölt sejtek a kis B típusú sejtek mérettartományába estek, kb. 10-30 µm átmérőjű sejtek mutattak immunpozitivitást. Elektronmikroszkópban megvizsgálva a jelölt sejteket, megtaláltuk bennük a duzzadt, sérült mitokondriumokat a hiányzó krisztákkal. A többi sejtalkotó ép ezekben a sejtekben, jelezve, hogy a mitokondriumok károsodása nem a hypoxiának vagy a hisztológiai procedúrának köszönhető. A VR1 pozitív sejtek mellett láthatók nem jelölt A és B sejtek, melyekben a mitokondriumok épek (*III/4. kép*).

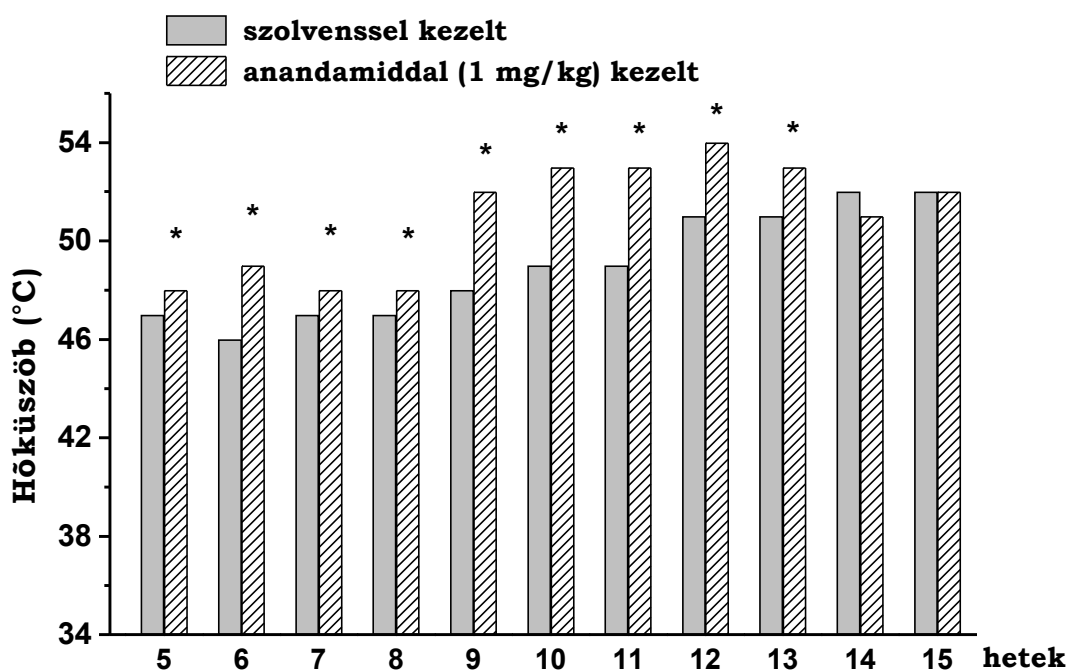
Tehát nem mindegyik B sejt VR-immunpozitív, és csak a VR1 pozitív sejtek mutatnak érzékenységet újszülöttkori anandamid kezelésre. Az összes VR1-immunpozitív sejtben megtaláltuk a károsodott mitokondriumokat (*III/4. kép*).

III/3. kép: Hat hetes, 2 naposan anandamiddal kezelt patkány fénymikroszkópos képe. A nyilak a VR1 immunpozitív sejteket jelölik. **A-B:** kisebb nagyítás, **C-D:** nagyobb nagyítás. **C:** A nyíllal jelölt immunpozitív sejt mellett egy nem jelölt A sejt (**A**) látható. **D:** Két immunpozitív sejt képe. Jel: A, B: 50 μm , C, D: 10 μm .

III/4. kép: Egy VR1 immunpozitív és immunnegatív sejt egymás melletti elektronmikroszkópos képe. **A:** Egy immunpozitív B sejt (**VR1**) szakadozott mitokondriumokkal (**m**) valamint egy intakt nem jelölt B sejt képe. **B:** Egy immunpozitív B sejt (**VR1**) és egy intakt A sejt egymás melletti képe. A sejthatárokat a nyilak jelzik. Jel: 0.5 μm .

Módosított tail-flick teszt

A harmadik héten a kontroll csoportban (n=6) 47°C volt a nociceptív hőküszöb átlagosan, az anandamiddal előkezelt állatoknál (n=5) 48°C. A különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. A III/1. ábra mutatja, hogy csak az ötödik héten lett szignifikáns a kontroll állatok és az előkezelt állatok közti különbség. A hőküszöb szignifikáns eltolódását egészen a 13. hétig tapasztaltuk az anandamiddal kezelt patkányok esetén (III/1. ábra). Érdekes módon a 14-15. héten már nem volt különbség a két csoportban mért értékek között. Hasonló reverzibilis küszöbemelkedés ismert felnőttkori capsaicin előkezelés után (Szolcsányi, 1990, 1993).



III/1. ábra: Újszülöttkori szisztémás anandamid kezelés hatása a hőküszöb alakulására

Megbeszélés

Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy az újszülöttkori szisztémás anandamid kezelés az érző ganglionokban szelektív és hosszan elhúzódó mitokondriális elváltozásokat okoz, csakúgy mint a capsaicin. Hasonlóképpen az anandamid is hosszan tartó antinocicepciót idéz elő. Az anandamid akut, antinociceptív hatásáról tail-flick teszttel vizsgálva már többen beszámoltak intratekális adásakor és ezt a hatást CB1 receptor izgatásával magyarázzák (Richardson és mtsai, 1998, Mason és mtsai, 1999, Houser és mtsai, 2000). Kísérleti eredményeink bizonyítják elsőként, hogy az anandamid egyszeri szisztémás adás esetén feltehetően VR1 receptor izgatását követően a capsaicinhez hasonlóan hetekig tartó antinocicepciót is ki tud váltani.

Mind a mitokondriumkárosodás ultrastruktúrális jelei, mind annak időbeli lefutása hasonló a capsaicin okozta változásokhoz (Joó és mtsai, 1969, Szolcsányi és mtsai, 1975, Szőke és mtsai, 1998), illetve a VR1 agonista RTX kezelés után kialakuló ultrastruktúrális eltérésekhez (Szallasi és mtsai, 1989, Szolcsányi és mtsai, 1990). Az egyetlen eltérés az, hogy anandamid kezelés után 24 órával nem találtunk nekrotikus sejteket a ganglionokban, melyről többen beszámoltak capsaicin kezelés után (Jancsó és mtsai, 1977, Jancsó és Király, 1981, Szőke és mtsai, 1998). Az anandamid kezelést sohasem követi a capsaicin kezelés utáni asphyxia és apnoe. Így ez a két megfigyelés alátámasztja feltételezésünket (Szőke és mtsai, 2002), mely szerint a capsaicinnel kezelt állatokban a respiratorikus stressz miatt kialakuló ischémia okozza a nekrotikus sejtek előfordulását, és nem a capsaicin akut neurotoxikus hatása.

Ahluwalia és munkatársai (2000) leírták, hogy a nociceptív elsődleges érző neuronokban a CB1 és VR1 receptorok együttes expressziója igen gyakori. A VR1 immunpozitív sejtek 98%-a mutat CB1 immunpozitivitást. Természetesen ahhoz, hogy teljes biztonsággal tudjuk állítani, hogy az anandamid kezelés hatására létrejövő változások a VR1 vagy a CB1 receptoron történtek, olyan sejteken kellene a hatást megvizsgálnunk, mely csak az egyik típusú receptort expresszálja. Az egész hippocampus

területén nagy számban vannak jelen CB1 immunreaktív sejtek (Egertova és Elphick, 2000). A hippocampusz CA3 áréájában, valamint a gyrus dentatus molekuláris rétegében lokalizáltak CB receptorokat (Herkenham és mtsai, 1991). Az interneuronok közül főként a kosársejtekben találtak CB1 immunpozitivitást (Katona és mtsai, 1999). Az a tény, hogy a hippocampusz területén az anandamid kezelés semmiféle ultrastrukturális elváltozást nem okoz arra utal, hogy az anandamid nem a CB1 receptoron keresztül, hanem a VR1 receptor aktiválását követően fejti ki a mitokondriumkárosító hatását. Ezt a következtetést támasztja alá az a másik eredményünk is, hogy újszülöttkori capsaicin előkezelés sem okoz a hippocampuszban mitokondriális duzzadást. Említésre méltó azonban, hogy PCR technikával kimutattak VR1 mRNS-t a hippocampuszban is (Sasamura és mtsai, 1998, Mezey és mtsai, 2000), de Caterina és munkatársai (1997) Northern blot módszerrel végzett hasonló vizsgálatai negatív eredményre vezettek. Ezen irodalmi adatok közötti ellentmondás oka nem ismeretes, de valószínű, hogy ha a hippocampusz néhány sejtjében VR1 expresszió PCR technikával kimutatható is, azok gyér előfordulása miatt nem vezet olyan mérvű intracelluláris kalciumion-akkumulációra mely már mitokondriális károsodást okozna.

Az eddig elvégzett *in vitro* kísérletek mellett az *in vivo* kísérleteink eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az anandamid az érző ganglionok B sejtjeinek mitokondriumait károsító hatásában a VR1 capsaicin receptor nagy valószínűséggel szerepet játszik.

IV. A MITOKONDRIUMOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A CAPSAICIN HATÁSMECHANIZMUSÁNAK KIALAKULÁSÁBAN PATKÁNY TRIGEMINÁLIS GANGLIONSEJT-TENYÉSZETEN INTRACELLULÁRIS KALCIUMIONSZINT-MÉRÉS MÓDSZERÉVEL.

Bevezetés

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a capsaicin illetve anandamid a trigeminális gangliontenyészet sejtjeiben kalciumion-akkumulációt vált ki (Szőke és mtsai, 2000). A kalciumion-koncentráció növekedés megváltoztatja a sejt funkcionális állapotát, módosítja membráncsatornák és receptor molekulák egy részét patkány érző neuronokban (Thayer és Miller, 1990). A szerteágazó részletek megértéséhez többet kell tudnunk a sejtben lévő kalciumion pufferek működéséről. Az intracelluláris kalcium-fluoreszcencia mérés felfedezte a pufferrendszer vizsgálatát is. Három tényező (a kalciumkötő fehérjék, az endoplazmás retikulum és a mitokondriumok) szabályozza az intracelluláris kalciumion koncentrációt és e pufferek feladata az időszakos kalciumion beáramlás következményeinek kivédése. A közreműködő mitokondriumok kulcsszerepet játszanak a celluláris energiaátalakításban is (Duchen, 1994). Különböző farmakonok (protonofórok, cianidok, ATP szintézis gátlók) képesek a mitokondriumok kalciumion-transzportját, metabolizmusát és membránpotenciálját változtatni (Duchen és Biscoe, 1992, Pozzan, 1994, Werth and Thayer, 1994, Chard és mtsai, 1995, Budd és mtsai, 1996, Nicholls és Budd, 2000) és ezek segítenek bizonyítani, hogy bár a mitokondriumok mindenfajta sejtben részt vesznek a kalciumion-homeosztázis fenntartásában, de feladatuk a két másik pufferhez képest az egyes sejtfeleségekben nem azonos.

Kísérleteinkben azt kerestük, hogy a tenyésztett trigeminális sejtekben a capsaicin akut hatására végbemenő kalciumionszint változás kialakításában mekkora szerepe van a mitokondriumoknak, hiszen közreműködésük pusztán tényező régen ismert (Bevan és Szolcsányi, 1990), és a

tartós mitokondrium duzzadás kardinális jele a deszenzitizációnak (I. I. fejezet). Célunk a capsaicin analóg RTX és a már korábban is vizsgált anandamid hatására létrejövő válaszok összehasonlító elemzése volt. Kontrollként, más szerzőkhöz hasonlóan, a KCl hatására létrejövő intracelluláris kalciumion-belépést használtuk, melynek hatására a kalciumionszint a feszültségfüggő kalciumcsatornák megnyitása révén emelkedik. A mitokondriumok kalciumtárolásának blokkolására a protonofór FCCP-t (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone) használtuk. Az FCCP hatására a mitokondriális belső membrán protonok számára átjárhatóvá válik, a membránban lévő ATP-szintetáz működése megfordul, az ATP-t a sejt felhasználja, ezért a sejtlégzés folyamata ellenőrizetlenné válik. Ilyenkor a mitokondriumban raktározott kalciumionok az intracelluláris cytosolba jutnak, ahol a jelenlévő fura-2 miatt fluoreszcencia növekedést láthatunk (Nicholls és Budd, 2000), így a kalcium-jel regisztrálása alkalmas a mitokondriumok funkcionális állapotának ellenőrzésére. Kísérleteinkben tehát azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a mitokondriumok kalciumion-akkumulációs képességének FCCP-vel történt felfüggesztése a feszültségfüggő kalciumcsatornákon, vagy a VR1 capsaicin receptor aktiváción keresztül kiváltott intracelluláris kalciumionszint-emelkedést. Ezen adatok összevetéséből információt nyerhetünk arra vonatkozóan, hogy milyen lényeges a szerepe a mitokondriumoknak a VR1 aktivációt követő intracelluláris magas kalciumionszint lecsökkentésében.

Módszerek

1. Patkány trigeminális ganglionsejt-tenyészet készítése: A tenyészet készítését a II. fejezet módszertani leírásánál ismertettem.

2. Intracelluláris kalciumionszint-mérés fluoreszcens módszerrel: A módszer ismertetése szintén megegyezik a II. fejezet módszertani részében leírtakkal.

3. *Capsaicin, resiniferatoxin, KCl és anandamid hatás vizsgálata:* A folyamatos tápoldat áramoltatása mellett rendszerünkben összesen 3 hatóanyag sejtekre adagolását tudjuk megoldani. A tápoldatot pár másodpercre a tesztelni kívánt anyagra cseréltük. Mivel az oldat nagyon közelről, közvetlenül a sejtekre áramlott, ezért biztosra vehető, hogy ismert koncentráció szerint érvényesül a sejtekre gyakorolt hatásuk. A capsaicint 100 nM, 330 nM és 3,3 μ M koncentrációban, az RTX-et 1 nM, az anandamidot 200 nM koncentrációban használtuk. Máskor a tápoldat NaCl tartalmát csökkentettük, viszont a KCl koncentrációját 50 mM-ra növeltük a magas kálium töménység következményeinek ellenőrzése céljából. A különböző kísérletekben különböző ideig alkalmaztuk az anandamidot, capsaicint, RTX-et és KCl-t, ezek a részletek az eredmények leírásában szerepelnek.

4. *A protonofór FCCP (1 μ M) kiváltotta intracelluláris kalciumionszint-növekedés vizsgálata:*

a. Hatásvizsgálat kontroll körülmények között, a sejtek bármilyen szerrel való előkezelése nélkül. Öt másodperces FCCP áramoltatás alatt ilyenkor csupán a mitokondriumok alap kalciumion tartalma ürül a citoplazmába, a kalcium-fluoreszcencia jel rendszerint nagyon kicsi.

b. Hatásvizsgálat valamilyen megelőző, a sejtekben kalciumion-akkumulációt keltő stimulus (capsaicin, RTX, anandamid vagy KCl adás) után alkalmazva. Az FCCP adagolás különböző időpontokban, vagy a stimuláló hatás lecsengése után, vagy annak fennállása közben, szintén 5 másodperces időtartamban történt. A figyelt változó a stimulus előtt mért és a rövid, kontroll FCCP adással keltett kalcium jelhez viszonyított fluoreszcencia növekedés volt. Az észlelt különbséget a stimuláló anyagnak a mitokondrium-kalciumpuffert befolyásoló effektusaként értékeltük.

Eredmények

Capsaicin, resiniferatoxin és KCl által kiváltott intracelluláris kalciumionszint változások vizsgálata

33 nM capsaicin 3 másodperces adása esetén az átlagos fluoreszcencia arány értékek a következőképpen alakultak: $R=0.33\pm 0.04$ ($n=14$ érzékeny sejt a 49-ből), 330 nM esetén $R=0.54\pm 0.24$ ($n=48/120$), és 3.3 μM hatására $R=0.81\pm 0.29$ ($n=25/50$). Két másodpercig adott 1 nM RTX után az átlagos fluoreszcencia érték $R=0.29\pm 0.19$ ($n=44/109$), 50 mM KCl szintén 2 másodperc alatt pedig nagyobb: $R=0.54\pm 0.21$ ($n=107/120$) kalcium-jelet okoz. Mint ahogy azt már korábban leírták (Werth és Thayer, 1994) a KCl kiváltott válasz esetén adatainkban is feltűnt egy korai tranziens csúcs, mely hamar (5-10 másodperc alatt) csökken, majd egy kb. 50 másodperces platós szakasz következik, mely után lassan (3-4 perc alatt) tér vissza a kezdeti (alap-) fluoreszcenciaérték. Ehhez hasonló válaszok ritkán előfordulnak ugyan a capsaicin és RTX alkalmazása esetén is, de ilyen két fázisú válaszok 50 mM KCl adására voltak jellemzők. A capsaicin és RTX hatásaként keltett jelalak tipikusan sokkal rövidebb ideig tart és benne plató szakasz csak elvértve alakul ki (III/1. ábra).

FCCP hatása a kalciumjelre

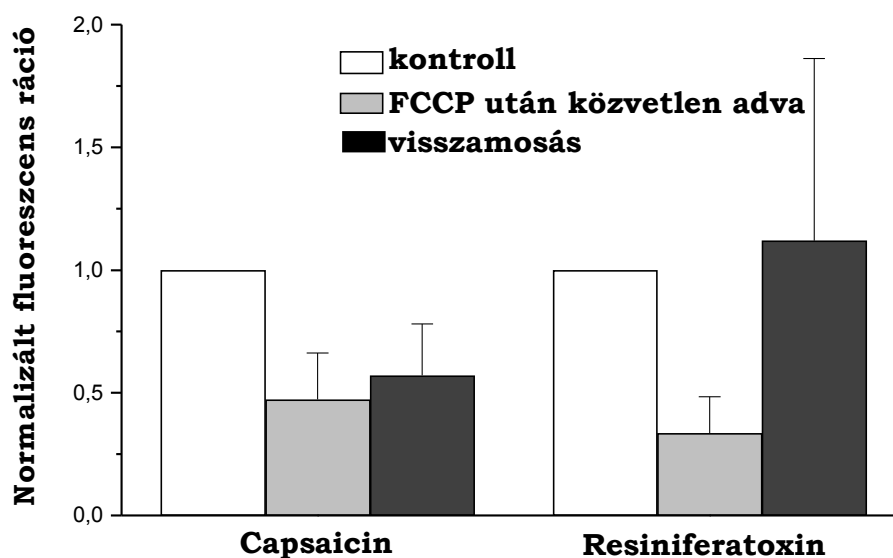
FCCP hatására a mitokondrium belső membránja depolarizálódik, a kalciumionok a citoplazmába ürülnek. Az intracelluláris kalciumionszint emelkedése ebben az esetben is a fluoreszcencia arány növekedését okozza, $R=0.098\pm 0.08$ ($n=271$). A reakció nagysága és kinetikája eltérést mutat az előzőeknél tapasztaltakhoz képest. Míg a capsaicinnél és RTX-nél a sejtek többségében a válasz 20 másodpercen belül lezajlott, az FCCP által kiváltott kisebb kalciumionszint növekedés átlagosan 10 másodperc után érte el a tetőpontját, és egy 20-50 másodperces lassú csökkenés volt megfigyelhető. Ez magyarázható azzal, hogy a hatás alatt a mitokondrium nem képes visszavenni a belőle felszabadult kalciumot (IV/1a. ábra).

Amennyiben az FCCP adását megelőzte egy olyan stimulus, amely megnövelte az intracelluláris kalciumionszintet, legyen az capsaicin, anandamid, RTX vagy KCl, az FCCP lényegesen nagyobb kalciumionszint-növekedést okozott. Ez az adat arra utal, hogy a kalciumion-homeosztázisban a mitokondriumok szerepe a trigeminális ganglionsejt-tenyészetekben is jelentős mértékű. Az FCCP-vel kiváltott átlagos normalizált R értékek az egyes megelőző stimulusok után a következőképpen alakultak: $R=10,8\pm 1,77$ 33 nM capsaicin esetén, $R=2,72\pm 2,04$ 330 nM esetén, $R=7,23\pm 3,46$ 3,3 μ M alkalmazása után és $R=3,66\pm 2,68$ a KCl után. Az adatokból kitűnik, hogy nincs összefüggés az FCCP által kiváltott jel nagyságának növekedése és a megelőző kalciumion-akkumulációt előidéző stimulus természeté között. A capsaicin receptorhoz kötődés által kiváltott, valamint a feszültségfüggő kalciumcsatornákon át beáramló ionok okozta kalciumnövekedés után a mitokondriumok belső membrán-depolarizációjának hatására egyaránt jelentősen nagyobb kalcium-jelet kaptunk mint az FCCP adás kontroll eseteiben. Összefüggés mutatkozott azonban az időintervallum és az FCCP jel nagysága között. Amennyiben a megelőző stimulus hatása még nem zajlott le, sokkal nagyobb jelet mérhettünk FCCP adásakor, mint fél perccel, vagy percekkel a reakció lezajlása után. Eszerint a mitokondriumok kalciumpufferelő hatása különösen a magas kalciumion-koncentrációknál jelentős, és az intracelluláris kalciumionszint csökkenésével párhuzamosan a mitokondriális kalciumionok kipumpálása is megkezdődik (IV/ 1b,c,d. ábra).

FCCP gátló hatása a capsaicin és RTX válaszra

A következőkben az volt a célunk, hogy protonofór FCCP adása után közvetlenül vizsgáljuk a különböző stimulusokra bekövetkező kalciumion-beáramlás következményeit. Ilyen körülmények között még nagyobb fluoreszcens jelekre számítottunk, mert a mitokondrium az FCCP hatás miatt képtelen pufferelő feladatát ellátni, a kalciumionszint nem marad egy viszonylag állandó szinten a sejtplazmában, hanem a beáramló kalciumionok sokáig kötetlen szabad ionként vannak jelen és növelik a fluoreszcens jelet. Várakozásunkkal ellentétben azonban azt tapasztaltuk, hogy ha a capsaicint

és RTX-et közvetlenül az FCCP után adtuk, akkor a válaszok sokkal kisebbek lettek mint ha csak a capsaicint vagy RTX-et egyedül adtuk volna (IV/3. ábra). Ismételt, FCCP nélküli adás után a válaszok ismét emelkedő tendenciát mutattak, ami különösen kifejezett volt az RTX esetében. Capsaicin (330 nM, n=18) adásakor a fluoreszcencia arány értékek a következőképp alakultak: capsaicin először- $R=0,4\pm0,17$, FCCP után- $R=0,19\pm0,1$, harmadik capsaicin- $R=0,21\pm0,11$. RTX (1 nM, n= 34) esetén az FCCP után adva a fluoreszcens értékek átlagosan 33.5%-ra estek vissza, majd ismételten önmagában adva 112 %-ot ért el a kalcium-jel (IV/2.,3. ábra). Az FCCP hasonló gátló hatását a KCl adás esetében nem tapasztaltuk.



IV/2. ábra: FCCP gátló hatása capsaicin és RTX által kiváltott intracelluláris kalciumakkumulációra

IV/3. ábra: FCCP gátló hatása az RTX által kiváltott intracelluláris kalciumionszint-emelkedésre.

Megbeszélés

A kísérletek összefüggést igazoltak a kalciumion-akkumuláció és a mitokondriumok működése között. A szenzoros neuronok relatíve kevés kalciumot raktározhatnak, többféle mechanizmussal rendelkeznek arra, hogy a kalciumionokat a cytosolból kipumpálják (Duchen 1994). Ha a sejteket kalciummal ideiglenesen feltöltjük, akár capsaicin és analógjai akár KCl alkalmazásával, a sejtben lévő kalciumion raktárak hamar telítődnek. A mitokondriumokban raktározott kalcium kiüríthető, például a fent említett FCCP-vel. Kísérleteinkben először mutattuk ki, hogy az FCCP gátolni képes a szenzoros neuronokban a capsaicin és resiniferatoxin hatására bekövetkező kalciumion-akkumulációt. E hatás mechanizmusa ismeretlen és további vizsgálatokat igényel. Valószínű, hogy FCCP adása után a mitokondriális funkció csökkenésével az ATP-szint is csökken, a VR1 receptor defoszforilálódik, ami irodalmi adatok szerint (Docherty és mtsai, 1996, Koplás és mtsai, 1997, Oh és mtsai, 1998, Szallasi és Blumberg, 1999) az ioncsatorna nyitási valószínűségének csökkenéséhez, vagyis deszenzitizációhoz vezet. A közelmúltban egy másik kutatócsoport (Dedov és Roufogalis, 2000) részben hasonló megközelítéssel más következtetésre jutott. Ők is hasonló kísérleteket végeztek szenzoros neuronokon, de sokkal hosszabb (30 másodperc) ideig alkalmazták a capsaicint, és ezután 2 és 50 perc között nézték az FCCP hatásokat. Ilyen körülmények között az FCCP capsaicin adása után nagyobb kalcium-jelet váltott ki, mint KCl adása után, ami arra utal, hogy a capsaicin tartósabb alkalmazása miatt több kalciumion akkumulálódott a mitokondriumokban, mint a KCl adását követően. Ez felhívja a figyelmet az egy két percen belüli és a tartósabb következmények celluláris mechanizmusai közt sejtett számottevő eltérésre, de a látszólagos ellentmondás feloldása további kísérleteket követel.

A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Újszülöttkori capsaicin előkezelés a trigeminális ganglionok B sejtjeiben lassan kialakuló mitokondriumkárosodást és lassan bekövetkező sejtszámcsökkenést okoz. Az egy hetes kezelt állatokban sejtszámcsökkenés nem tapasztalható, ez csak a három hetes patkányoknál látható, tehát a kialakuló sejtszámcsökkenés lassan bekövetkező folyamat, és nem a capsaicin okozta akut neurotoxikus sejthalál eredménye.
2. NGF kezelés a capsaicin okozta sejtszámcsökkenést és a kemonocéptív deszenzitizációt kivédi, míg a capsaicin okozta mitokondriumkárosodásra és plazma extravazációra nincs hatással.
3. Először igazoltuk kísérleteinkben, hogy az anandamid a capsaicinhez hasonló intracelluláris kalciumionszint-növekedés kiváltására képes szenzoros neurontenyészetben.
4. Igazoltuk, hogy az anandamid nanomoláris koncentrációban gátolni képes a capsaicin hatására kialakuló kalciumion-akkumulációt a neurontenyészetben mely hatásban vagy parciális VR1 receptor antagonisták hatás vagy cannabinoid receptor aktiváció játszik szerepet.
5. Kísérleteinkkel elsőként igazoltuk, hogy az újszülöttkori szisztémás anandamid kezelés az érző ganglionokban a capsaicin hatásához hasonlóan szelektív és hosszan elhúzódó mitokondriális elváltozásokat okoz, melyet hosszan tartó antinocicepció kísér. A hatás kialakulásában a VR1 receptornak nagy valószínűséggel szerepe van. A mitokondriumkárosodás mind ultrastrukturális jeleiben, mind az időbeli lefutásában hasonló a capsaicin okozta változásokhoz.
6. Anandamid kezelés hatására mitokondriumkárosodást mutató sejteken sikerült kimutatni VR1 receptorok jelenlétét.
7. A VR1 agonisták hatásában sikerült igazolnunk a mitokondriumok közreműködését a szenzoros neurontenyészetben. Elsőként mutattuk ki a protonofór FCCP gátló hatását a capsaicin és RTX által kiváltott intracelluláris kalciumionszint emelkedésre.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítségemre voltak abban, hogy ez a disszertáció elkészüljön. Mindenekelőtt Szolcsányi János professzor úrnak és Czéh Gábor professzor úrnak, akik munkámat témavezetőként ötleteikkel, tanácsaikkal és kritikáikkal mindvégig irányították, és akiktől sokat tanultam a neurofarmakológia és a neurofiziológia területén. Köszönöm Seress László professzor úrnak aki bevezetett a szövettan és az elektronmikroszkópia világába, és aki mind a kísérletek elvégzésében mind az eredmények közlésében a segítségemre volt. Ugyancsak köszönettel tartozom munkatársaimnak: Dr Balla Zsoltnak, Dr Czéh Boldozsárnak, Dr Helyes Zsuzsannának, Dr Németh Józsefnek, Dr Pethő Gábornak és Dr Pintér Erikának akik egy-egy kísérletsorozatban segítettek a munkámban. Köszönöm a gondos és megbízható segítséget asszisztensnőnknek, Búzási Ádámné Annának, akire nemcsak a kísérletek közben számíthattam, hanem a kísérleti elrendezések beállításában is. Az elektronmikroszkópos laboratórium asszisztensnőinek Domján Gáborné Máriának és Lórándné Miskey Juditnak szintén köszönettel tartozom az elektronmikroszkópos anyag elkészülésében nyújtott segítségükért, valamint Paleszter Máriának, akitől a szövettani és immunfestési technikákat tanultam. Köszönettel tartozom a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának, és a Magyar Tudományos Akadémia támogatásának, hogy nyugodt munkahelyi légkörben dolgozhattam. Végül köszönettel tartozom családomnak, elsősorban szüleimnek és férjemnek, akik megértésükkel és türelmükkel nagy mértékben hozzájárultak, hogy a munkámat elvégezhessem.

HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Ahluwalia J., Urban L., Capogna M., Bevan S., Nagy I. 2000. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 100, 685-688.

Andres, K.H. 1961. Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 55, 1-48.

Arvidsson, M.E., Ygge, J., 1986. A quantitative study of the effects of neonatal capsaicin treatment and of subsequent peripheral nerve transection in the adult rat. *Brain Res.* 397, 130-136.

Beltramo M., Piomelli D. 1999. Anandamide transport inhibition by the vanilloid agonist olvanil. *Eur. J. Pharmacol.* 364, 75-78.

Bevan, S., Szolcsányi, J., 1990. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 330-333.

Blumberg, P.M., Szallasi, Á., Ács, G. 1993. Resiniferatoxin – an ultrapotent capsaicin analogue. In *Capsaicin in the Study of Pain.* ed. J.N. Wood., pp. 45-62. Academic Press, London.

Budd S.L., Nicholls D.G. 1996. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J. Neurochemistry* 66, 403-411.

Calandra B., Portier M., Kerneis A., Delpech M., Carillon C., Le Fur G., Ferrara P., Shire D. 1999. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 374, 445-55.

Calignano A., La Rana G., Giuffrida A., Piomelli D. 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394, 277-281.

Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channels in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

- Caulfield M.P., Brown D.A. 1992. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 106, 231-232.
- Chard P.S., Bleakman D., Savidge J.R., Miller R.J., 1995. Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience* 65, 1099-1108.
- Chiba T., Masuko S., Kawano H., 1986. Correlation of mitochondrial swelling after capsaicin treatment and substance P and somatostatin immunoreactivity in small neurons of dorsal root ganglion in the rat. *Neurosci. Lett.* 64, 311-316.
- Dedov V.N., Roufogalis B.D., 2000. Mitochondrial calcium accumulation following activation of vanilloid (VR1) receptors by capsaicin in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 95, 183-188.
- Devane W.A., Dysarz F.A. 3rd, Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34, 605-13.
- Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.
- Di Marzo V., Bisogno T., De Petrocellis L. 2001. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 346-349.
- Di Marzo V., Melck D., Bisogno T., De Petrocellis L. 1998. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21, 521-528.
- Docherty R.J., Yeats J.C., Bevan S., Boddeke H.W.G.M. 1996. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflügers Arch. Eur. J. Pharmacol.* 431, 828-837.
- Duchen M.R. 1994 Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem. J.* 283:41-50.
- Duchen M.R., Biscoe T.J. 1992. Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *J. Physiol.* 450:13-31.

- Egertová M., Elphick M.R. 2000 Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB1. *J. Comp. Neurol.* 442, 159-171.
- Farquhar-Smith W.P., Egertová M., Bradbury E.J., McMahon S.B., Rice A.S., Elphick M.R. 2000. Cannabinoid CB1 receptor expression in rat spinal cord. *Molecular Cell. Neurosci.* 15, 510-521.
- Fimiani C., Mattocks D., Cavani F., Salzet M., Deutsch D.G., Pryor S., Bilfinger T.V., Stefano G.B. 1999. Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release. *Cell-Signal.* 11, 189-93.
- Houser S.J., Eads M., Embrey J.P., Welch S.P. 2000. Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Delta(9)-THC and anandamide. *Brain Res.* 857, 337-42.
- Herkenham M., Lynn A.B., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R. and Rise K.C. 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro radiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563-583.
- Hiura A., 2000. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. *Arch. Histol. Cytol.* 63, 199-215.
- Hiura A., Ishizuka H., 1989. Changes in features of degenerating primary sensory neurons with time after capsaicin treatment. *Acta Neuropathol.* 78, 35-46.
- Holzer P. 1988. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins and other neuropeptides. *Neuroscience* 24, 739-768.
- Holzer P. 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin neurones. *Pharmacol. Rev.* 43, 143-201.
- Holzer P. 1992. Capsaicin: selective toxicity for thin primary sensory neurons. In: Herke, H., Huchs, F. (Eds.), Handbook of Experimental Pharmacology. *Selective Neurotoxicity*, vol. 102. Springer Heidelberg, pp. 419-481.
- Högyes A. 1878. Beitrage zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des Capsicum annum. *Arch. Exp. Path. Pharmac.*, 9, 117-130.

- Jancsó G., Karcsu S., Király E., Szebeni A., Tóth L., Bacsy E., Joó F., Párducz A. 1984. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res.* 295, 211-216.
- Jancsó G., Király E., 1981. Sensory neurotoxins: chemically induced selective destruction of primary sensory neurons. *Brain Res.* 210, 83-89.
- Jancsó G., Király E., Jancsó-Gábor A. 1977. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270, 741-743.
- Jancsó G., Király E., Such G, Joó F., Nagy A. 1987. Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. *Acta Physiol. Hung.* 69, 295-313.
- Jancsó N., Jancsó-Gábor A., Szolcsányi J. 1967. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 31, 138-151.
- Jancsó-Gábor A., Szolcsányi J., Jancsó N., 1970. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. *J. Physiol.* 208, 449-459.
- Jancsó N. 1955. Speicherung. Stoffanreicherung in Retikuloendothel und in der Niere. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- Joó F., Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A., 1969. Mitochondrial alterations in the spinal ganglion cells of the rat accompanying the long-lasting sensory disturbance induced by capsaicin. *Life Sci.* 8, 621-626.
- Katona I., Sperlág B., Sik A., Kafalvi A., Vizi E.S., Mackie K. and Freund T.F. 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axonal terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 19, 4544-4558.
- Koplas P.A., Rosenberg R.L., Oxford G.S. 1997. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurones. *J. Neurosci.* 17, 3525-3537.
- Königsmark B.W., 1970. Methods for counting of neurons. In: Nauta, W.J.H., Ebbesson, S.O.E. (Eds.), *Contemporary research methods in neuroanatomy*, Springer-Verlag, New York, pp. 315-340.
- Kress M., Reeh P.W., Vyklicky L. 1997. An interaction of inflammatory mediators and protons in small diameter dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neurosci Lett.* 224, 37-40.

Lawson S.N., 1987. The morphological consequences of neonatal treatment with capsaicin on primary afferent neurones in adult rats. *Acta Physiol. Hung.* 69, 315-321.

Lawson S.N., Harper A.A., 1984. Neonatal capsaicin is not a specific neurotoxin for sensory C-fibres or small dark cells of rat dorsal root ganglia. In: Chahl, L.A., Szolcsányi, J., Lembeck, F. (Eds.), *Antidromic Vasodilatation an Neurogenic Inflammation*, Akadémia Kiadó, Budapest, pp. 111-118.

Lawson S.N., Waddell P.J. 1991. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J. Physiol.* 435, 41-63.

Lieberman A.R., 1976. Sensory ganglia. In: Landon, D.N. (ed), *The Peripheral Nerve*, Chapman and Hall, London, pp. 178-188.

Lipton P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431-1568.

Liu L., Simon S.A. 1996 Capsaicin-inducated currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* 75, 1503-1514.

Liu L., Szallasi A., Simon S.A., 1998. A non-pungent resiniferatoxin analogue, phorbol 12-phenylacetate 13 acetate 20-homovanillate, reveals vanilloid receptor subtypes on rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 84, 569-81.

Lynn B., Carpenter S.E., Pini A., 1984. Capsaicin and cutaneous afferents. In: Chahl, L.A., Szolcsányi, J., Lembeck, F. (Eds.), *Antidromic Vasodilatation an Neurogenic Inflammation*, Akadémia Kiadó, Budapest, pp. 83-92.

Marsh S.J., Stansfeld C.E., Brown D.A., Davey R., McCarthy D., 1987. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons *in vitro*. *Neuroscience* 23, 275-290.

Mason D.J. Jr., Lowe J., Welch S.P. 1999. Cannabinoid modulation of dynorphin A: correlation to cannabinoid-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 378, 237-48.

Matsuda, L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. 1990. Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564.

- McCarthy M., Kent C., Mayhew T.M., 1999. Effects of neonatal capsaicin administration on the number and volume of neurons in left and right T10 dorsal root ganglia in the rat. *J. Neurocytol.* 28, 161-169.
- Mendell L.M., 1999. Neurotrophin action on sensory neurons in adults: an extension of the neurotrophic hypothesis. *Pain* 6, 127-132.
- Mezey É., Tóth Z.E., Cortright D.N., Arzubi M.K., Krause J.E., Elde R., Guo A., Blumberg P.M., Szallasi Á. 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3655-3660.
- Nagy J.I., Iversen L.L., Goedert M., Chapman D., Hunt S.P. 1983. Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J. Neurosci.* 3, 399-406.
- Nagy J.I., Vincent, W.M., Staines, A., Fibiger, H.C., Reisine, T.D., Yamamura, H.I. 1980. Neurotoxic action of capsaicin on spinal substance P neurons. *Brain Res.* 186, 435-444.
- Nicholls D., Budd L.S. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80:315-360.
- Oh U., Shin J.S., Hwang S.W., Cho H.W., Jung J.Y., Kwak J.Y., Kim M.R., Lee S.Y., Kang C.J. 1998. The activity of capsaicin-activated channel is reduced by dephosphorylation. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 721.7.
- Otten U., Lorez H.P., Businger F. 1983. Nerve growth factor antagonize the neurotoxic action of capsaicin on primary sensory neurones. *Nature* 301, 515-517.
- Poling J.S., Rogawski M.A., Salem N. Jr., Vicini S. 1996. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K⁺ channels. *Neuropharmacology.* 35, 983-91.
- Pozzan T., Rizzuto R., Wolpe P., Meldolesi J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74:595-636.
- Richardson J.D., Kilo S. and Hargreaves K.M. 1998 Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 75, 111-119.

- Rinaldi-Carmona M., Barth F., Heaulme M., Alonso R., Shire D., Congy C., Soubrie P., Breliere J.C., Le Fur G. 1995. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.* 26, 1941-7.
- Rinaldi-Carmona M., Barth F., Heaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., Martinez S., Maruani J., Neliat G., Caput D. 1994. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350, 240-4.
- Saria A., Skofitsh G., Lembeck F., 1982. Distribution of capsaicin in rat tissues after systemic administration. *J. Pharm. Pharmacol.* 34, 273-75.
- Sasamura T., Sasaki M., Tohda C., Kuraishi Y. 1998. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport.* 9, 2045-8.
- Scadding J.W., 1980. The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves. *J. Anat.* 131, 473-484.
- Shu X., Mendell L.M., 1999. Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. *Neurosci. Lett.* 274, 159-162.
- Smart D., Gunthorpe M.J., Jerman J.C., Nasir S., Gray J., Muir A.I., Chambers J.K., Randall A.D., Davis, J.B. 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* 129, 227-230.
- Smart D., Jerman J.C. 2000. Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends in Pharmacol. Sci.* 21, 134.
- Sugimoto T., Takayama A., Xiao C., Takano-Yamamoto T., Ichikawa H., 1999. Electron microscopic demonstration of nick end-labeled DNA fragments during capsaicin-induced apoptosis of trigeminal primary neurons in neonatal rats. *Brain Res.* 818, 147-152.
- Sugimoto T., Xiao C., Ichikawa H. 1998, Neonatal primary neuronal death induced by capsaicin and axotomy involves an apoptotic mechanism. *Brain Res.* 807, 147-154.
- Szallasi A., Blumberg P.M. 1990. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life. Sci.* 47, 1399-1408.
- Szallasi A., Blumberg P.M., 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159-211.

Szallasi A., Joó F., Blumberg P. 1989 Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia of rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. *Brain Res.* 503, 68-72.

Szallasi A., Di Marzo V. 2000 New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci.* 23, 491-497.

Szolcsányi J. 1982. Capsaicin type pungent agents producing pyrexia. In: Milton, A.S. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology, Pyretics and Antipyretics*, vol. 60. Springer-Verlag, Berlin, pp. 437-478.

Szolcsányi J. 1984. Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: Chahl, L.A., Szolcsányi, J. and Lembeck, F. (Eds.), *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*, Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 27-53.

Szolcsányi J. 1990. Capsaicin, irritation and desensitization. Neurophysiological basis and future perspectives. In: Green, B.G., Mason, J.R., Kare, M.R. (Eds.), *Irritation, Chemical Senses*, vol. 2. Marcel Dekker, New York and Basel, pp. 141-168.

Szolcsányi J. 1993. Actions of capsaicin on sensory receptors. In Wood, J. (Ed.) *Capsaicin in the Study of Pain*. Academic Press, London, pp. 1-26.

Szolcsányi J. 1996. Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. In: Kumazawa, T., Kruger, L. and Mizumura, K. (Eds.) *Progress in Brain Research*. Vol. 113., Elsevier, Amsterdam, pp. 343-359.

Szolcsányi J. 2000. Are cannabinoids endogenous ligands for the VR1 capsaicin receptor? *Trends in Pharmacol. Sci.* 21, 41-42.

Szolcsányi J. 2000. Anandamide and the question of its functional role for activation of capsaicin receptors. *Trends in Pharmacol. Sci.* 21, 203-204.

Szolcsányi J., Helyes Zs., Oroszi G., Németh J., Pintér E. 1998a. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.* 123, 936-942.

Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A. 1975. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung*. 25, 1877-81.

Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A. 1976. Sensory effects of capsaicin congeners. Part II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung*. 26, 33-7.

Szolcsányi J., Jancsó-Gábor A., Joó F. 1975. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 287, 157-169.

Szolcsányi J., Joó F., Jancsó-Gábor A. 1971. Mitochondrial changes in preoptic neurones after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermodetectors in rats. *Nature* 299, 116-117.

Szolcsányi J., Pintér E., Helyes Zs., Oroszi G., Németh J. 1998b. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br. J. Pharmacol.* 125, 916-922.

Szolcsányi J., Szallasi A., Szallasi Z., Joó F., Blumberg P.M. 1990. Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 923-928.

Szolcsányi J., Szöke É., Seress L. 1998. Reevaluation of the neurotoxic effect of neonatal capsaicin treatment on rat's trigeminal sensory neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 91.12.

Szöke É., Balla Zs., Csernoch L., Czéh G., Szolcsányi J. 2000. Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. *Neuroreport* 11, 1949-52.

Szöke É., Seress L., Szolcsányi J. 1998. Reevaluation of the neurotoxic effect of neonatal capsaicin treatment on the basis of morphometrical studies. *Neurobiology* 6, 477-478.

Szöke É., Seress L., Szolcsányi J. 2002. Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of the B cells of the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience* (in press)

Tandrup T., Woolf C.J., Coggeshal R.E. 2000. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J. Comp. Neurol* 422, 172-80.

Thayer S.A., Miller R.J. 1990. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J. Physiol.* 425, 85-115.

Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Baumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.

Vasquez C., Lewis D.L. 1999. The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors. *J. Neurosci.* 19, 9271-80.

Vyklicky L., Knotkova-Urbancova H., Vitaskova Z., Vlachova V., Kress M., Reeh P.W. 1998. Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *J. Neurophysiol.* 79, 670-6.

Werth J.L., Thayer S.A. 1994. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 14, 348-356.

Winter J., Forbes C.A., Sternberg J., Lindsay R.M., 1988. Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron* 1, 973-81.

Winter J., Woolf C., Lynn B., 1993. Degenerative and regenerative responses of sensory neurones to capsaicin-induced damage. In: Woods, J.N. (Ed.), *Capsaicin in the Study of Pain*, Academic Press, New York, pp. 139-160.

Wood J.N., Coote P.R., Minhas A., Mullaney I., McNeill M., Burgess G.M. 1989. Capsaicin-induced ion fluxes increase cyclic GMP but not cyclic AMP levels in rat sensory neurones in culture. *J Neurochem.* 53, 1203-11.

Zygmunt P.M., Julius D., Högestätt E.D., Di Marzo V. 2000. Anandamide – the other side of the coin. *Trends in Pharmacol. Sci.* 21, 43-44.

Zygmunt P.M., Petersson J., Andersson D.A., Chuang H-h., Sörgård M., Di Marzo V., Julius D. and Högestätt E.D. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452-457.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

KÖZLEMÉNYEK

É. Szőke, L. Seress, J. Szolcsányi: Reevaluation of the neurotoxic effect of neonatal capsaicin treatment on the basis of morphometrical studies. 1998, *Neurobiology* 6 (4) pp. 477-478.

É. Szőke, Zs. Balla, L. Csernoch, G. Czéh, J. Szolcsányi: Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. 2000, *Neuroreport* 11 (9) pp. 1949-52.

L. Seress. **É. Szőke**, G. Czéh: Age related mitochondrial damage in the B-type cells of the rat trigeminal ganglia. 2002, *Acta Biologica Hungarica* 53(1-2) pp. 167-175.

Zs. Balla, **É. Szőke**, G. Czéh, J. Szolcsányi: Effect of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations. Közlésre elfogadva: *Acta Biologica Hungarica*

É. Szőke, L. Seress, J. Szolcsányi: Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of the B cells of the rat trigeminal ganglia.

Közlésre elfogadva: *Neuroscience*

É. Szőke, G. Czéh, J. Szolcsányi, L. Seress: Neonatal anandamide treatment results in prolonged mitochondrial damage of the B cells of the rat trigeminal ganglia.

Közlésre benyújtva: *Neuroscience*

FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT ELŐADÁSKIVONATOK

Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi and G. Czéh: Changes of free calcium ion concentration in sensory neurons. 1999, *Neurobiology* 7 (3) pp. 280.

É. Szőke, Zs. Balla, J. Szolcsányi and G. Czéh: Capsaicin-sensitive voltage-gated ionic currents in sensory neurons. 1999, *Neurobiology*, 7 (3) pp. 392-393.

Becze Zs., **Szőke É.**, Szolcsányi J., Czéh G.: Ultrastructure and electrophysiology of sensory neurons in capsaicin-pretreated rats. 1999, *Neurobiology* 7 (3) pp. 284.

É. Szőke, L. Seress, J. Szolcsányi: Capsaicin-induced cell death of sensory neurons of the neonatal rat are prevented by in vivo NGF treatment. 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13.

Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi, G. Czéh: Capsaicin in low concentration modulates voltage-gated ionic currents in vanilloid sensitive trigeminal nerve-cells in slice preparation. 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13.

G. Czéh, Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi : Membrane current and intracellular calcium changes induced by capsaicin and anandamide in the rat's isolated trigeminal neurones *J. Physiol. London*, 2000, 526. P.

É. Szőke, G. Czéh, Zs. Balla, J. Szolcsányi: Capsaicin and anandamide induced current and calcium changes in sensory neurones
Eur. J. Neurosci. 12, p308, 2000

Zs. Balla, **É. Szőke**, G. Czéh , J. Szolcsányi: Effects of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations
Eur. J. Neurosci. 12, p309, 2000

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK JEGYZÉKE

Becze Zs., **Szöke É.**, Szolcsányi J., Czéh G.: Trigeminal ganglion neuronok intracelluláris vizsgálata és biocytin jelölése

MÉT LXII. Vándorgyűlése, 1997, Pécs, **előadás**

Szöke É., Seress L., Szolcsányi J.: Újszülöttkori capsaicin előkezelés neurotoxikus hatásának átértékelése morfometriai vizsgálatok alapján

MITT V. Konferenciája, 1998, Debrecen, **poszter**

Balla Zs., **Szöke É.**, Czéh G., Szolcsányi J.: Capsaicin-indukált kation áramok trigeminal ganglion B-típusú sejtjeiben

II. Országos Ph.D. Konferencia, 1998, Debrecen, **előadás**

Szöke É., Balla Zs., Czéh G., Szolcsányi J.: Capsaicin-indukált kation áramok trigeminal ganglion B-típusú sejtjeiben

II. Országos Ph.D. Konferencia, 1998, Debrecen, **poszter**

J. Szolcsányi, **É. Szöke**, L. Seress: Reevaluation of the neurotoxic effect of neonatal capsaicin treatment on rat's trigeminal sensory neurons

Society for Neuroscience, 28th annual meeting, Los Angeles, California, 1998, **poszter**

Zs. Balla, **É. Szöke**, J. Szolcsányi and G. Czéh: Changes of free calcium ion concentration in sensory neurons

MITT VI. Konferenciája, 1999, Harkány, **előadás**

É. Szöke, Zs. Balla, J. Szolcsányi and G. Czéh: Capsaicin-sensitive voltage-gated ionic currents in sensory neurons

MITT VI. Konferenciája, 1999, Harkány, **előadás**

Becze Zs., **Szôke É.**, Szolcsányi J., Czéh G.: Ultrastructure and electrophysiology of sensory neurons in capsaicin-pretreated rats
MITT VI. Konferenciája, 1999, Harkány, **poszter**

É. Szôke, L. Seress, J. Szolcsányi: Capsaicin-induced cell death of sensory neurons of the neonatal rat are prevented by in vivo NGF treatment
Second European congress of Pharmacology, 1999, Budapest, **előadás**

Zs. Balla, **É. Szôke**, J. Szolcsányi, G. Czéh: Capsaicin in low concentration modulates voltage-gated ionic currents in vanilloid sensitive trigeminal nerve-cells in slice preparation
Second European congress of Pharmacology, 1999, Budapest, **poszter**

É. Szôke, L. Seress, J. Szolcsányi: On the toxicity of neonatal capsaicin treatment
The primary Nociceptive Neuron, Official Meeting of the 9th World Congress on Pain, 1999, Prague, Czech Republic, **poszter**

Zs. Balla, **É. Szôke**, J. Szolcsányi, G. Czéh: Depression of voltage-gated sodium and potassium currents by capsaicin
The primary Nociceptive Neuron, Official Meeting of the 9th World Congress on Pain, 1999, Prague, Czech Republic, **poszter**

L. Vyklicky, V. Vlachova, A. Lyfenko, **É. Szôke**: Membrane currents induced by noxious heat and capsaicin in cultured DRG neurons
The primary Nociceptive Neuron, Official Meeting of the 9th World Congress on Pain, 1999, Prague, Czech Republic, **előadás**

Szôke É., Balla Zs., Czéh G., Szolcsányi J.: Capsaicin által kiváltott calciumszint változás sejtszintű vizsgálata fluoreszcens módszerrel
IBRO-MITT Millenniumi Konferencia 2000, Budapest, **poszter**

G. Czéh, Zs. Balla, **É. Szőke**, J. Szolcsányi : Membrane current and intracellular calcium changes induced by capsaicin and anandamide in the rat's isolated trigeminal neurones

The Joint Meeting of the Physiological Society with the Hungarian Physiological Society, 2000, Budapest, **előadás**

É. Szőke, G. Czéh, Zs. Balla, J. Szolcsányi: Capsaicin and anandamide induced current and calcium changes in sensory neurones

Forum of European Neuroscience, Millennium Meeting, 2000, Brighton, UK., **poszter**

Zs. Balla, **É. Szőke**, G. Czéh , J. Szolcsányi: Effects of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations

Forum of European Neuroscience, Millennium Meeting, 2000, Brighton, UK., **poszter**

Szőke É., Czéh G., Szolcsányi J.: Mitokondrium és kalcium szignál

MITT VIII. Konferenciája, 2001, Szeged, **előadás**

Gábrriel, R., Dénes, V., **Szőke, É.**, Czéh, G.: Calcium-kötő fehérjék hátsó gyöki dúc primer tenyészeteken

MITT VIII. Konferenciája, 2001, Szeged, **poszter**

Szőke É., Czéh G., Seress L., Szolcsányi J.: Anandamid által kiváltott elhúzódó mitokondrium-károsodás vizsgálata patkány trigeminális ganglionsejtekben

MÉT LXVI. Vándorgyűlése, 2001, Szeged, **poszter**

Pethő G., Almási R., **Szőke É.**, Szolcsányi J.: Anandamid, resiniferatoxin és analgetikumok hatása a nociceptív hőküszöbre

MÉT LXVI. Vándorgyűlése, 2001, Szeged, **előadás**

Varga A., **Szőke É.**, Czéh G., Szolcsányi J.: Effect of protein kinase inhibitors on capsaicin-evoked desensitization

IBRO International Workshop on Signalling Mechanisms in the Central and Peripheral Nervous System, 2002, Debrecen, **poszter**